



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología**

**Potencial antibacteriano de los metabolitos  
extracelulares producidos por el actinomiceto marino  
*Streptomyces M10-77***

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo y  
Parasitólogo**

**AUTOR**

**Juan José APONTE UBILLÚS**

**ASESOR**

**Mg. Jorge LEÓN QUISPE**

**Lima, Perú**

**2011**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Aponte, J. (2011). *Potencial antibacteriano de los metabolitos extracelulares producidos por el actinomiceto marino Streptomyces M10-77*. Tesis para optar el título de Biólogo Microbiólogo y Parasitólogo. Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## Agradecimientos

A mi único Dios, nuestro Señor Jesucristo, fuente creadora de todo aquello que nos rodea y maravilla al mismo tiempo. Por estar siempre a mi lado y enseñarme que en la vida hay que encomendarse a Él con sincera confianza, y que lo demás llega por añadidura.

A mis abuelos, personas muy trabajadoras que más que maestros fueron y siguen siendo un ejemplo de vida; son muestra de que el amor, tanto directa como indirectamente, es el eje central del desarrollo de la persona, de la familia y de la sociedad.

A mis padres, Héctor y Graciela, por su cariño, por su entrega desmesurada, por sus consejos. Por ser mis guías en este largo camino de desarrollo personal y profesional. Por darme amor y preocuparse por mi educación.

A mi hermano Héctor, por ser un ejemplo moral y profesional a seguir. Por todas sus argumentaciones y críticas que aunque a veces duras, tienen el objetivo de ayudar a formar un criterio científico al nivel de un biólogo sanmarquino.

A mi hermana Ana Lucía, que a su niñez, con sus actitudes y elocuencias, trae a mi memoria la premisa que las cosas más bellas de la vida poseen una simpleza única.

A Liliana, por su amor y comprensión en todo este largo camino que aún no acaba, y que parece que recién empieza. A ti te entrego mi amor, mi cariño, y te dedico este trabajo como muestra de mi esfuerzo y dedicación, fruto de una pasión y sana diversión por la investigación.

A mis estimadores profesores Susana Gutierrez, Miguel Talledo y Enrique Escobar, de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM, por su tiempo y consejos en estos 5 años de estudios académicos y especialmente en estas últimas semanas, como parte de sus importantes observaciones para que la presente tesis mantenga un alto nivel de calidad académica.

A la doctora Rosario Rojas Durán, jefa de la Unidad de Investigación en Productos Naturales (UIPN) – Universidad Peruana Cayetano Heredia, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme su experiencia y apoyo durante el desarrollo del presente trabajo. A su vez mi agradecimiento a la Lic. Candy Ruiz y a la Q.F. Giovana Espinoza, por su ayuda y orientación en el trabajo, así como por su amistad.

Finalmente, a mi asesor y amigo, Mag. Jorge León Quispe, quien hace un poco más de 3 años apostó por este joven y le brindó una oportunidad. Mil gracias por compartir sus conocimientos y experiencias, pero sobre todo por la confianza brindada en todo este tiempo.

# INDICE

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
2.1 El Phylum <i>Actinobacteria</i> .- Generalidades	5
2.2 El Género <i>Streptomyces</i>	9
2.3 Actinomicetos de ambientes marinos	14
2.4 Compuestos bioactivos producidos por actinomicetos marinos	17
2.5 Compuestos bioactivos.- potencial inhibitorio y sinérgico entre moléculas.	22
2.6 Fraccionamiento biodirigido de metabolitos activos	26
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1 Hipótesis	30
3.2 Objetivos	30
3.2.1 Objetivo general	30
3.2.2 Objetivos específicos	30
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
4.1 Material Biológico	32

4.2 Metodología	32
4.2.1 Prueba cualitativa de antagonismo mediante el bioensayo de “doble capa”	32
4.2.2 Obtención de metabolitos extracelulares	33
4.2.3 Extracción química de compuestos bioactivos	33
4.2.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto orgánico activo	34
4.2.5 Localización tentativa del metabolito activo por bioautografía	35
4.2.6 Fraccionamiento parcial del extracto activo por cromatografía en columna	35
4.2.7 Bioensayo de sinergismo con antibióticos referenciales	36
4.2.8 Caracterización morfológica – bioquímica de la cepa en estudio	37
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
5.1 Prueba cualitativa de antagonismo mediante el bioensayo de “doble capa”	38
5.2 Obtención de metabolitos extracelulares	39
5.3 Extracción química de compuestos bioactivos	40
5.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto orgánico activo	41
5.5 Localización tentativa del metabolito activo por bioautografía	43
5.6 Fraccionamiento parcial del extracto activo por cromatografía en columna	44
5.7 Bioensayo de sinergismo con antibióticos referenciales	46
5.8 Caracterización morfológica – bioquímica de la cepa en estudio	47
<b>6. DISCUSION</b>	<b>50</b>

<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>61</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>63</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>75</b>

## RESUMEN

En los últimos treinta años, los actinomicetos marinos han representado una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos, con estructuras químicas y propiedades biológicas nunca vistas en sus homólogos terrestres. El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar el potencial antibacteriano de los metabolitos producidos por el actinomiceto marino M10-77. La evaluación preliminar mediante la prueba de “doble capa” mostró gran capacidad inhibitoria de la cepa en estudio, generando halos de inhibición cercanos a 70 mm de diámetro contra patógenos Gram positivos y halos de tamaño reducido contra Gram negativos. Estos datos se vieron reflejados en el ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto diclorometánico, donde los resultados más notorios fueron contra una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina, *S. saprophyticus* 7694 y *Streptococcus sp.* 7751 (1,9; 1,9 y 0,9 µg/mL, respectivamente) todas de origen clínico. El extracto activo fue fraccionado y parcialmente purificado por cromatografía en columna, obteniéndose cuatro fracciones orgánicas. Estas mostraron poseer actividad antimicrobiana moderada y menor a la del extracto original, hecho que se interpreta como un fenómeno de sinergismo, lo que motivó la realización del bioensayo de sinergismo aplicado a antibióticos. Los resultados mostraron la capacidad sinérgica de la fracción II con antibióticos beta lactámicos y aminoglucósidos frente a *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), potenciando la actividad de la bencilpenicilina, cefotaxima y ceftriaxona hasta por 128 veces, y mejorando la actividad de la estreptomicina y gentamicina hasta por 8 veces. Finalmente, la cepa M10-77 fue clasificada dentro del género *Streptomyces* en base a características morfológicas y a información brindada sobre su identificación molecular. Se concluye que la cepa *Streptomyces* M10-77 es una cepa multi-productora de metabolitos antibacterianos de potente actividad y a su vez de metabolitos con capacidad sinérgica sobre antibióticos de referencia.

**Palabras clave:** *Streptomyces*, antagonismo, sinergismo, fraccionamiento biodirigido.



## ABSTRACT

In the last thirty years, marine actinomycetes have become an important source of new bioactive compounds, with chemical structures and biological properties never seen in their terrestrial homologous. The main objective of this recent work was to evaluate the antibacterial potential of the metabolites produced by the marine actinomycete M10-77. The preliminary test through the double layer assay showed great inhibitory activity of the strain in study, generating inhibition zones with values around 70 mm diameter against Gram positive pathogens and reduced inhibition zones against Gram negative pathogens. These data was reflected in quantitative values through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assay of the dichloromethanic extract obtained from strain M10-77. The most promising values were founded against a methicillin – resistant *S. aureus* strain, *S. saprophyticus* 7694 and *Streptococcus sp.* 7751 (1,9; 1,9 and 0,9 µg/mL, respectively); all of these strains came from clinical origin. The active extract was fractionated and partially purified by column chromatography, obtaining 4 organic fractions. These showed less antimicrobial activity than original extract, fact that was interpreted as a phenomenon of synergism. Based on this criterion, a synergism bioassay with antibiotics was done. The results showed good synergistic activity of fraction II with beta lactam and aminoglycoside antibiotics against *S. aureus* ATCC 43300 (MR-SA), enhancing the activity of bencil penicillin, cefotaxim, and ceftriaxone as well as 128 times the real value; and streptomycin and gentamycin as well as 8 times the real value. Finally, strain M10-77 was classified inside the genus *Streptomyces* based on morphological characteristics and given information about its molecular identification. It is concluded that *Streptomyces* M10-77 isolated from marine depths is a producer strain of multiple antibacterial metabolites of high potency and at the same time, of synergistic metabolites with bioactivity under antibiotics of medical reference.

**Keywords:** *Streptomyces*, antagonism, synergism, bio guided fractionation.

## 1. INTRODUCCIÓN

La drogo-resistencia, sea de tipo natural o adquirida, es una propiedad inherente de muchos microorganismos para poder colonizar nuevos nichos, adaptarse y persistir. La expresión de enzimas modificadoras de antibióticos, bombas de flujo y otros inhibidores, son sólo algunos mecanismos mostrados por diferentes grupos microbianos, hecho que evidencia la riqueza genética adquirida durante su desarrollo evolutivo. Particularmente en el caso de las bacterias, a pesar que sólo un pequeño porcentaje de estas pueden causar daño al hombre, éste reducido grupo de microorganismos es responsable de graves problemas de salud tanto en países de primer mundo como en aquellos en vías de desarrollo.

Los indicios de infecciones causadas por bacterias multi-drogo-resistentes (MDR) datan aproximadamente de la mitad del siglo XX. El descubrimiento de la Penicilina por Alexander Fleming fue uno de los hallazgos más importantes en la historia de la ciencia, pues permitió salvar innumerables vidas a partir de la producción y distribución del fármaco previamente mencionado (Belloso, 2009). Sin embargo, pocos años pasaron para que algunos microbios desarrollaran resistencia a este lactámico y obligara a los científicos a crear nuevos antibióticos, iniciándose de esta manera una carrera interminable hasta la actualidad, del desarrollo de nuevos fármacos eficaces frente a las bacterias MDR.

En la actualidad, la mayor incidencia de estos patógenos se encuentra en los nosocomios, desencadenando las conocidas infecciones intrahospitalarias que afectan a pacientes inmunodebilitados. Cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a beta lactámicos, *Enterococcus sp.* resistente a vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a lactámicos, glicopéptidos y aminoglucósidos, entre otras cepas pueden apreciarse en los perfiles de

antibiograma realizados en muchos hospitales, lo que evidencia la rápida expansión de estas cepas resistentes (OMS, 2001). Las consecuencias de estas infecciones son fallas en la respuesta al tratamiento (enfermedad prolongada y mayor riesgo de muerte), periodos más largos de infectividad y rotación a drogas de segunda o tercera línea que son más caras y más tóxicas. El impacto económico de la resistencia a los antimicrobianos es difícil de evaluar y debe ser visto desde diferentes perspectivas. La perspectiva del hospital esta dada por el incremento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes y sus costos asociados. La perspectiva del paciente es el efecto a largo plazo en su salud, pérdida de trabajo y tiempo de la familia asociado con la estancia hospitalaria y la recuperación prolongada. La perspectiva social esta constituida por los costos del cuidado de la salud asociados con tratamiento de infecciones resistentes; en Estados Unidos han sido estimados en 4 a 7 billones de dólares anualmente (OMS, 2001).

Se deben tomar medidas de control en todos los nosocomios para evitar la constante aparición de brotes infecciosos así como la expansión de estos microorganismos fuera del hospital, último hecho que ha generado la aparición de cepas “asociadas a las comunidades” (Battouli *et al.*, 2003) dando un nuevo rumbo al enfoque de infecciones hospitalarias y a la multirresistencia.

A nivel nacional, el problema de la multi-drogo-resistencia resulta alarmante. En el informe elaborado por el Instituto Nacional de Salud (2007) basado en 7 hospitales de referencia nacional, se reportaron a los agentes bacterianos *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulasa negativo, *P. aeruginosa*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *E. coli* como los más recurrentes en infecciones intrahospitalarias. La prevalencia de la resistencia del *S. aureus* a la meticilina (u oxacilina) de cepas procedentes de pacientes que se encontraban hospitalizados es de 66,7%, valor

que se ve incrementado cuando solo se analiza los aislamientos procedentes de pacientes hospitalizados en Cuidados Intensivos (82,1%). Por otra parte, *P. aeruginosa* está mostrando altos índices de resistencia a una gran variedad de drogas, siendo preocupante en estos momentos la resistencia a carbapenems. A su vez, las cepas de *E. coli* aisladas de cuidados intensivos han mostrado un índice de resistencia de 85% a la cefotaxima, valor que argumentan los especialistas parece deberse a la manifestación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido. (INS, 2007).

Las bacterias MDR, especialmente las de origen clínico, constituyen hoy en día uno de los blancos prioritarios para el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos. El avance científico y tecnológico en las tres últimas décadas ha permitido contar con modernos métodos de diagnóstico y tratamiento que permiten combatir las diferentes enfermedades infecciosas; sin embargo, se observa la emergencia de nuevos agentes y la re-emergencia de otros, constituyéndose en un desafío para los especialistas (Salazar, 2008). La prevalencia de cepas multi resistentes es mayor en países en vías de desarrollo, por lo que su presencia en los principales nosocomios de nuestro país constituye una realidad alarmante. Estas bacterias son las que cobran muchas vidas de los pacientes de la red de hospitales de Lima.

Ante la búsqueda de nuevos antibacterianos eficaces frente a estos patógenos, los actinomicetos de origen marino de nuestro litoral constituyen una fuente promisoría de nuevas biomoléculas activas, útiles para combatir este grave problema en salud pública.

Los actinomicetos marinos conforman un grupo bacteriano diverso con capacidades metabólicas y fisiológicas únicas que les permite no sólo sobrevivir en

condiciones extremas, sino también producir compuestos con actividades farmacológicas nunca antes vistas en sus homólogos terrestres (Olano *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta que estos microorganismos habitan principalmente en sedimentos y asociados a organismos superiores (Lam, 2006; Maldonado *et al.*, 2005; Bernan, 2001), en las últimas décadas se ha intensificado la búsqueda de nuevos actinomicetos marinos usando técnicas de aislamiento tradicionales y modernas debido a la enorme variedad de fuentes potenciales de aislamiento, muchas de las cuales no han sido exploradas a la actualidad.

Se han ido identificando nuevos compuestos bioactivos a partir de actinomicetos marinos. El más resaltante en los últimos años es la Salinosporamida obtenida de *Salinispora sp.*, uno de los primeros géneros de actinomicetos de requerimiento marino obligado (Fenical *et al.*, 2008).

La bibliografía nos muestra una particularidad de géneros de actinomicetos bioactivos, sin embargo el género microbiano con mayor cantidad de compuestos aislados e identificados a la fecha, no sólo de origen marino sino también terrestre, es *Streptomyces*. Dos tercios de los fármacos comercializados de origen microbiano son producidos por bacterias de este género (Podust *et al.*, 2004).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 El Phylum *Actinobacteria*.- Generalidades

Dominio *Bacteria*

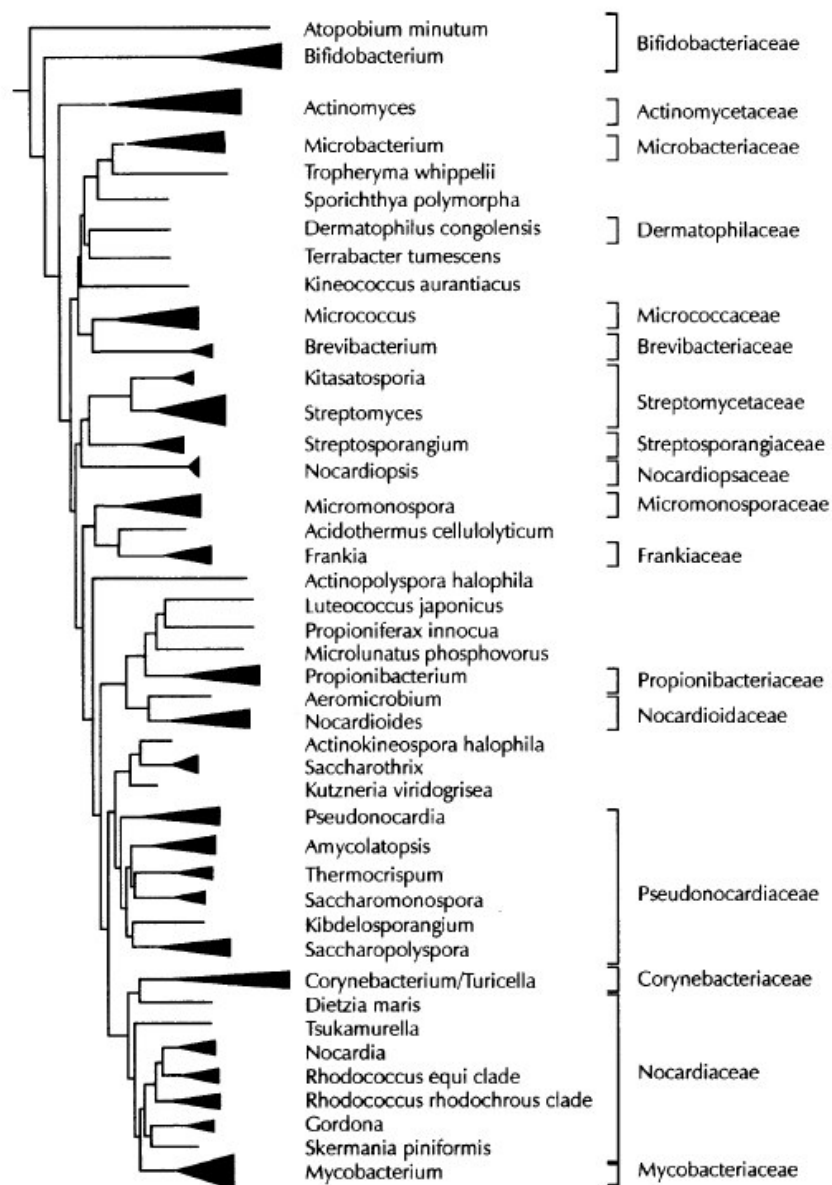
Phylum *Actinobacteria*

El Phylum *Actinobacteria* comprende una extensa variedad de microorganismos de amplia distribución. La principal característica de este grupo de bacterias Gram positivas corresponde a los altos niveles de G + C de su ADN; así como el desarrollo de una estructura micelial (Hopwood, 2000), última cualidad compartida únicamente por los grupos más representativos de actinomicetos como los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, y *Mycobacterium*.

En los últimos cuarenta años, se desarrollaron herramientas taxonómicas que permitieran la correcta identificación genérica y supragenérica de los actinomicetos (Goodfellow, 1989; Embley & Stackebrandt, 1994), donde resaltan las herramientas moleculares como las más certeras y significantes. El análisis filogenético basado en las secuencias de ARN ribosomal 16S permitió clasificar a estos microorganismos en 16 familias las cuales comprenden más de un centenar de géneros (Figura 1).

La distribución de los actinomicetos en la naturaleza es ubicua. Los suelos y sedimentos son ambientes propicios para la colonización de estas bacterias por medio del desarrollo de hifas vegetativas, asociadas a un micelio aéreo donde la diferenciación celular conlleva a la producción de esporas (Figura 2). Estas estructuras son resistentes tanto a la temperatura como a otras condiciones

adversas, característica que les permite persistir en ambientes que muestran condiciones de stress abiótico (Hopwood, 2000).

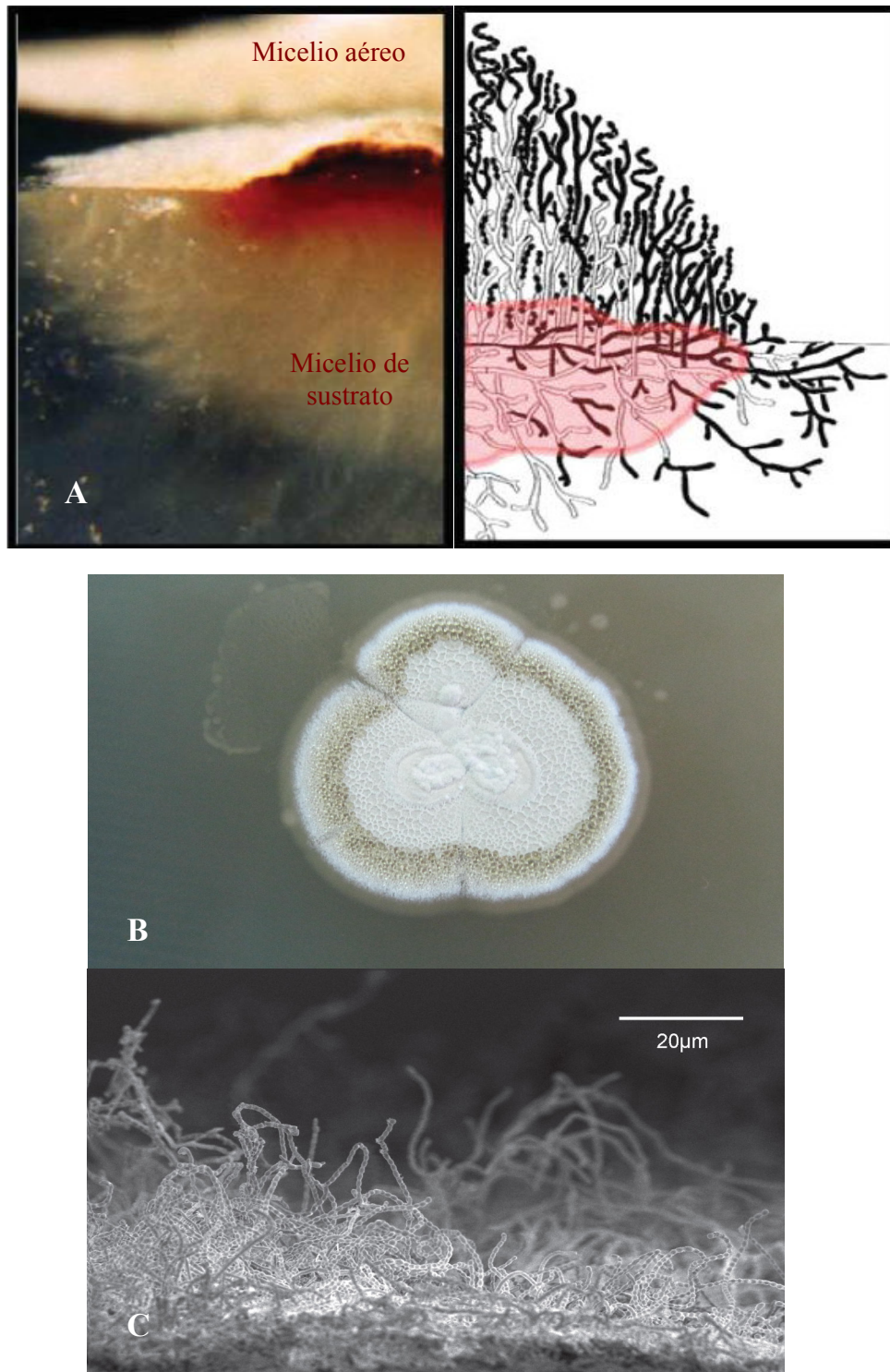


**Figura 1.** Árbol filogenético que muestra la clasificación de los actinomicetos. Este árbol fue realizado con secuencias completas de RNA ribosomal 16S. Tomado de Hopwood (2000).

La gran mayoría de este grupo de microorganismos se comporta como saprofitos naturales en su ambiente, cumpliendo un rol importante en el ciclo del carbono y transformación de la materia orgánica. La gran complejidad química de los metabolitos producidos por los actinomicetos les permite participar en diferentes relaciones ecológicas, desde relaciones químicas dentro de una población microbiana (Bibb, 2005) hasta relaciones interespecíficas que relacionan la cooperación de ciertos actinomicetos con algunos organismos superiores (Dharmaraj & Sumantha, 2009; Schoenian *et al.*, 2011). Un ejemplo lo constituye la gama de enzimas extracelulares producidas por actinomicetos. Se han realizado una vasta cantidad de estudios en biotecnología basados en la obtención y purificación de enzimas de interés industrial mediante la fermentación de cepas de este grupo microbiano (Ercicun *et al.*, 1990; El Shahed *et al.*, 2008; Narayana & Vijayalakshmi, 2009). La producción de enzimas *in situ* permite el catabolismo de compuestos orgánicos como carbohidratos, lípidos, y compuestos de naturaleza compleja como los recalcitrantes.

Otro ejemplo, probablemente el más citado, lo constituye la producción de antibióticos. La producción de antibióticos por actinomicetos está ligada con el fenómeno ecológico de antagonismo bacteriano, en el que la producción de sustancias inhibitorias por un microorganismo a condiciones específicas puede reducir o limitar el crecimiento de otra población, generando variaciones en la estructura de comunidades microbianas. Los estudios de producción de antibióticos en actinomicetos datan de los años cuarenta, cuando Waksman y sus colaboradores publicaron el descubrimiento de la actinomicina (Waksman & Woodruff, 1941), la estreptomycinina (1944), y posteriormente la neomicina (Waksman & Lechevalier, 1949) a partir de especies del género *Streptomyces*.





**Figura 2.** A. Esquema de desarrollo micelial de una cepa de actinomiceto, mostrando el micelio aéreo, micelio de sustrato, y entre ambos puede apreciarse la segregación de un metabolito coloreado. Tomado de Chater (2006). B. Fotografía de una colonia de actinomiceto (Phylum *Actinobacteria*) donde se muestra íntegramente su micelio aéreo. C. Microfotografía del micelio aéreo de una especie del género *Streptomyces*. Tomado de Elliot *et al.*, (2008).

Con el objetivo de desarrollar y descubrir antibacterianos de mayor eficacia, los científicos continuaron con las investigaciones y años más tarde surgieron la tobramicina (1967), gentamicina (1958) y sisomicina (1978), siendo los dos últimos antibióticos obtenidos a partir de distintas especies del género *Micromonospora*. (Wagman; 1980). De esta manera la carrera biotecnológica por la búsqueda de nuevos antimicrobianos fue establecida y actualmente sigue siendo la línea de investigación principal de muchos institutos y laboratorios.

Además del comportamiento saprofita, algunas especies de actinomicetos suelen ejercer otros efectos sobre los agentes con los que se relacionan. Así, algunas especies de actinomicetos cumplen un rol patológico sobre especies animales o vegetales, este es el caso de *Streptomyces scabies*, patógeno de la papa (*Solanum tuberosum*); *Actinomyces sp.* y *Mycobacterium tuberculosis* los cuales son patógenos para el ser humano.

Algunos pocos actinomicetos ejercen una relación simbiótica con hospederos. El caso mas evidente corresponde a la bacteria del género *Frankia*, el cual se asocia íntimamente a la rizósfera de algunas plantas (Del Tredici, 1995).

## 2.2 El género *Streptomyces*

Dominio *Bacteria*  
Phylum *Actinobacteria*  
Clase *Actinobacteria*  
Subclase *Actinobacteridae*  
Orden *Actinomycetales*  
Suborden *Streptomycineae*  
Familia *Streptomycetaceae*  
Género *Streptomyces*

*Streptomyces* constituye el género de actinomicetos más estudiado desde el punto de vista industrial y biotecnológico durante los últimos 50 años. Más del 50% de los microorganismos productores de antibióticos registrados en la industria pertenecen únicamente a este género, desplazando a los hongos, algas y algunos otros géneros bacterianos (Hopwood, 2000). Esta característica conllevó a muchos investigadores a realizar estudios intensivos de bioprospección microbiana con el objetivo de aislar cepas de *Streptomyces* productoras de compuestos bioactivos. Esto trajo consigo aumento del conocimiento de nuevas especies de este género, sin embargo acarreó consigo un problema taxonómico importante.

Las especies del género *Streptomyces* obedecen patrones fenotípicos y quimio-taxonómicos comunes: son colonias secas, pulverulentas o de aspecto “yesoso”, las cuales tienden a formar un micelio de sustrato fuertemente adherido a la superficie, además de un micelio aéreo el cual contiene las esporas bacterianas (León *et al.*, 2007) (Figura 3).

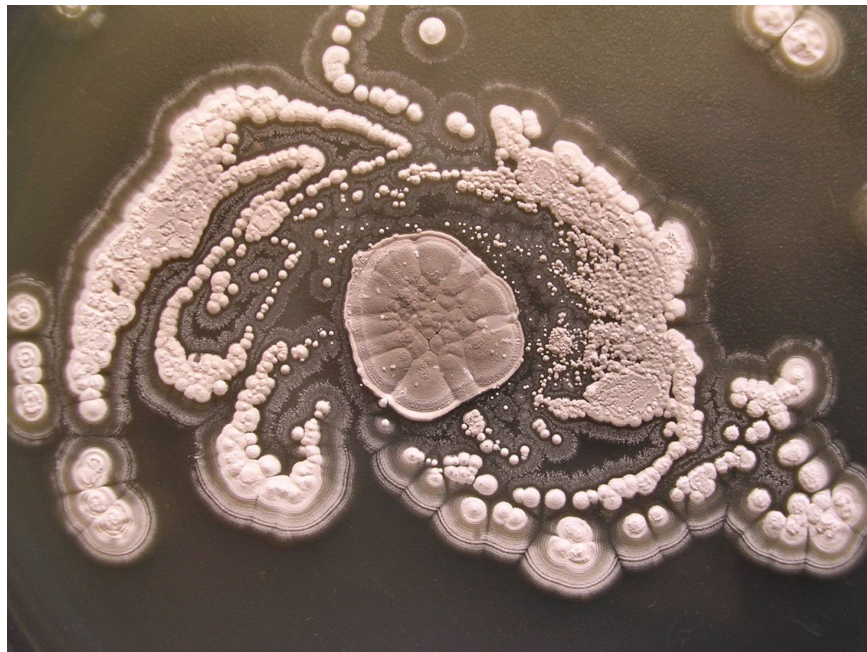
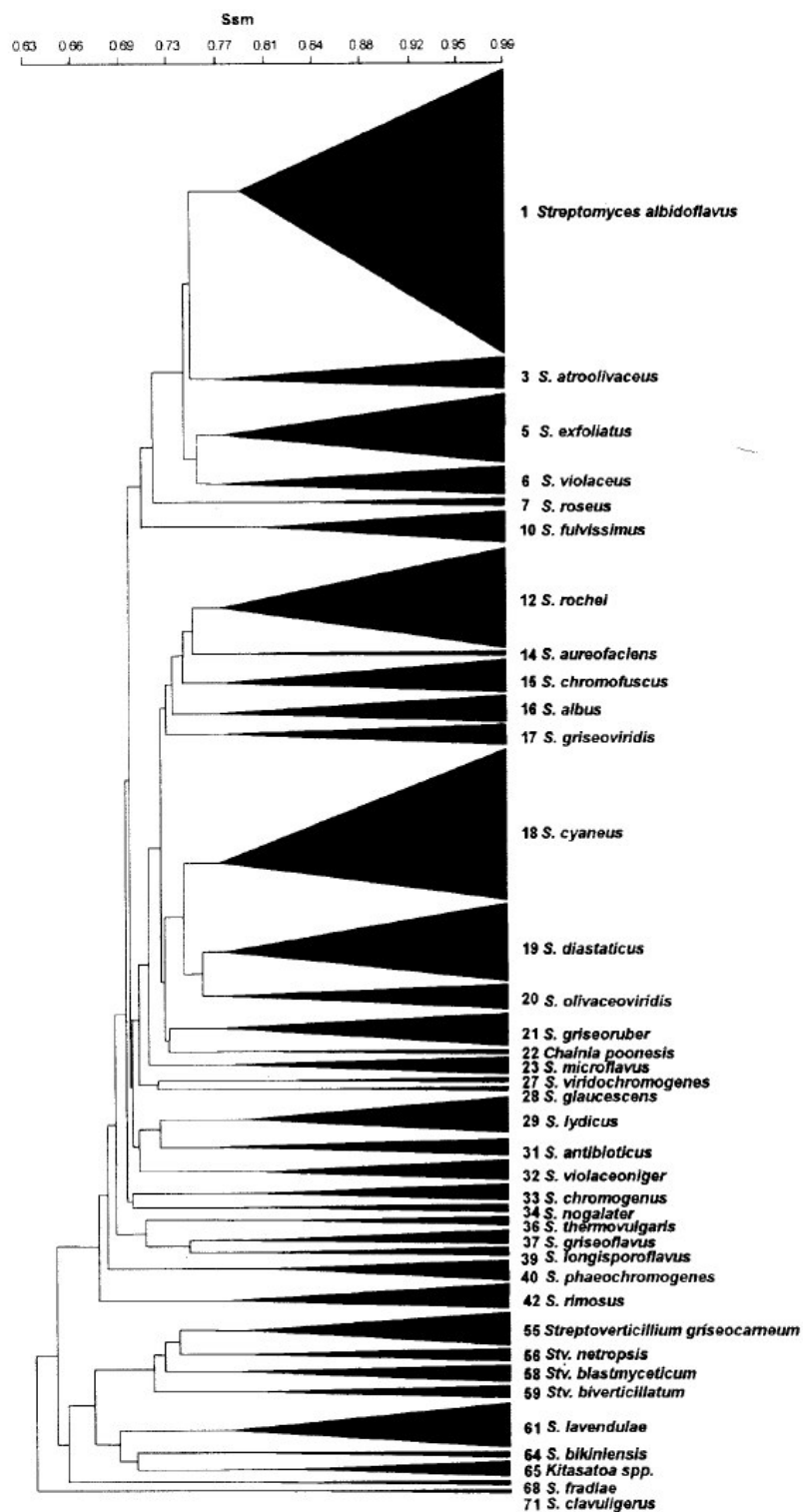


Figura 3. Colonia típica de bacterias del género *Streptomyces*, cultivada en Agar Marino. Fotografía brindada por Mag. Jorge León.

El estudio de pared celular permitió clasificar a las bacterias de este género con la característica de presentar ácido LL – diaminopimélico en la pared de péptidoglucano del micelio vegetativo (Wellington *et al.*, 1992), así como la presencia de azúcares como glucosa. Los vacíos taxonómicos se evidenciaron al momento de proceder con la identificación de la especie. Puesto que muchas cepas aparentemente de la misma especie mostraban patrones bioquímicos muy diferentes, la certeza de la identificación era de un nivel bajo. Desde 1964, el *International Streptomyces Project* (ISP) brindó un alcance para la identificación de especies a partir de un número reducido de caracteres fenotípicos, con el fin de evitar y reducir el aumento desmesurado de registro de “nuevas especies” cuando en realidad podía tratarse de una misma. Los aportes brindados por el ISP, reforzados por la aparición de las técnicas moleculares, llevaron a una aproximación de mayor nivel. Los estudios realizados por Williams *et al.*, (1983) (Figura 4) y Stackebrandt *et al.*, (1991, 1992) permitieron una mejor aproximación a la identificación de especies del género *Streptomyces*.



**Figura 4.** Dendrograma que muestra los principales clusters de especies características del género *Streptomyces*. Para elaborar dicho dendrograma, se recurrieron a los caracteres fenotípicos usando un Coeficiente simple de enlace (Ssm). Tomado de Williams *et al.*, (1983). Las especies pertenecientes a los clusters de *Kitasatoa*, *Streptoverticillium* y *Chainia* han sido reubicadas actualmente dentro del género *Streptomyces*.

Como la mayoría de actinomicetos, las bacterias del género *Streptomyces* son ubicuas en la naturaleza. Son habitantes del suelo y tierra agrícola en densidades oscilantes entre  $10^4$  y  $10^6$  por gramos de suelo (Labeda & Shearer, 1990). Su habilidad de colonizar el suelo es facilitada por su forma de crecimiento vegetativo, el cual puede diferenciarse en esporas para asistir con la función de diseminación en el nicho y de persistir ante condiciones ambientales adversas, como condiciones bajas de nutrientes y escasez de agua (Karagouni *et al.*, 1993). La germinación de esporas es parcialmente dependiente de la densidad de la bacteria así como de algunos nutrientes exógenos, agua y calcio (Triger *et al.*, 1991). La capacidad de producción de enzimas y compuestos antimicrobianos es un factor importante en la colonización del nicho; de esta manera pueden encontrarse cepas de *Streptomyces* asociadas a la rizósfera de algunas plantas, donde estos microorganismos deben ejercer un efecto antagónico frente a otras poblaciones como efecto de la competencia por colonizar dicho hábitat.

Algunas especies del género *Streptomyces* cumplen otros roles ecológicos además de comportarse como saprófitos en el ambiente. Este es el caso, aunque limitado, de la especie *S. somaliensis*, la cual suele generar actinomicetomas en el cráneo y algunos tejidos (Nasher & Hay, 1998). En plantas, las especies *S. scabies* y *S. acidiscabies* son productores de patologías vegetales denominadas “costra simple” y “costra ácida”, respectivamente. Algunas otras especies de este género se encuentran ligadas a ciertas patologías vegetales debido a la capacidad del organismo de descomponer la pared lignocelulósica, el floema, así como otros tejidos parenquimáticos (Kennedy & Alcorn, 1980; Blanchette *et al.*, 1981). Vale mencionar el caso de *S. thermoautotrophicus*, del cual se evidenció su capacidad de ser quimiolitótrofo oxidador de hidrógeno obligado, capaz de desarrollarse a partir de una fuente de monóxido de carbono, y de ser fijador de nitrógeno (Gadkari *et al.*, 1992).

### 2.3 Actinomicetos de ambientes marinos

Los actinomicetos han sido vinculados por muchos años como microorganismos netamente predominantes de suelo, hipotetizándose que una expansión biogeográfica de este grupo microbiano hacia ambientes acuáticos podría darse como fruto del contacto de las corrientes marinas y lacustres con el ambiente terrestre (Goodfellow & Haynes, 1984). Esta hipótesis estuvo basada en ciertas evidencias como el alto grado de tolerancia a salinidad de muchas especies de actinomicetos terrestres (Okasaki & Okami, 1976), la producción de esporas resistentes de actinomicetos presentes en hábitat marinos, y la aparente disminución de la abundancia de actinomicetos cultivables conforme uno se aleja de la orilla marítima (Walter & Collwel, 1975; Weyland & Helmke, 1988; Jensen *et al.*, 1991).

Con el paso del tiempo nuevas investigaciones basadas en cultivos convencionales y técnicas moleculares (Helme & Weyland, 1984; Jensen *et al.*, 1991; Moran *et al.*, 1995; Colquhoun *et al.*, 1998) generaron evidencia suficiente que refutaba la idea anterior. Algunos de estos estudios mostraron la presencia de nuevas especies de actinomicetos dependientes de algunos determinantes ambientales, siendo la salinidad el factor más estudiado. Mincer *et al.* (2002) reportaron el aislamiento de un nuevo grupo de actinomicetos que dependen obligadamente de cloruro de sodio. Este grupo, denominado originalmente MAR 1, fue propuesto como un nuevo género microbiano de nombre “*Salinispora*”. A la fecha, se han determinado dos especies de este género (*S. tropica* y *S. arenicola*) las cuales han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista sistemático, molecular y biotecnológico debido a sus mecanismos adaptativos y a su producción de nuevos compuestos bioactivos.

Los actinomicetos se encuentran bien distribuidos en los diferentes ambientes marinos. En la microcapa superficial o neuston por ejemplo, si bien no es el grupo microbiano más abundante, se encuentra presente junto a otro grupo importante como es *Cytophaga* - *Flavobacterium* – *Bacteroides* (Agogué *et al.*, 2005). La relativa abundancia de actinomicetos está asociada en algunos casos con la concentración de materia orgánica presente (Ward & Bora, 2006).

En la columna de agua se han realizado diversos estudios para conocer la diversidad y abundancia de los diferentes grupos microbianos. De esta manera, las técnicas recientes en metagenómica permitieron determinar dieciséis grupos predominantes, los cuales mostraron un patrón de abundancia similar tanto para aguas pelágicas como costeras. Dentro de estos grupos, *Cyanobacteria* era el más dominante en el océano abierto. La actinobacterias posee un rango medio de abundancia junto con *Beta Proteobacteria* y *Gamma Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Cytophaga* – *Flavobacterium* – *Bacteroides* y *Chlorobia*. (Rappe *et al.*, 2000).

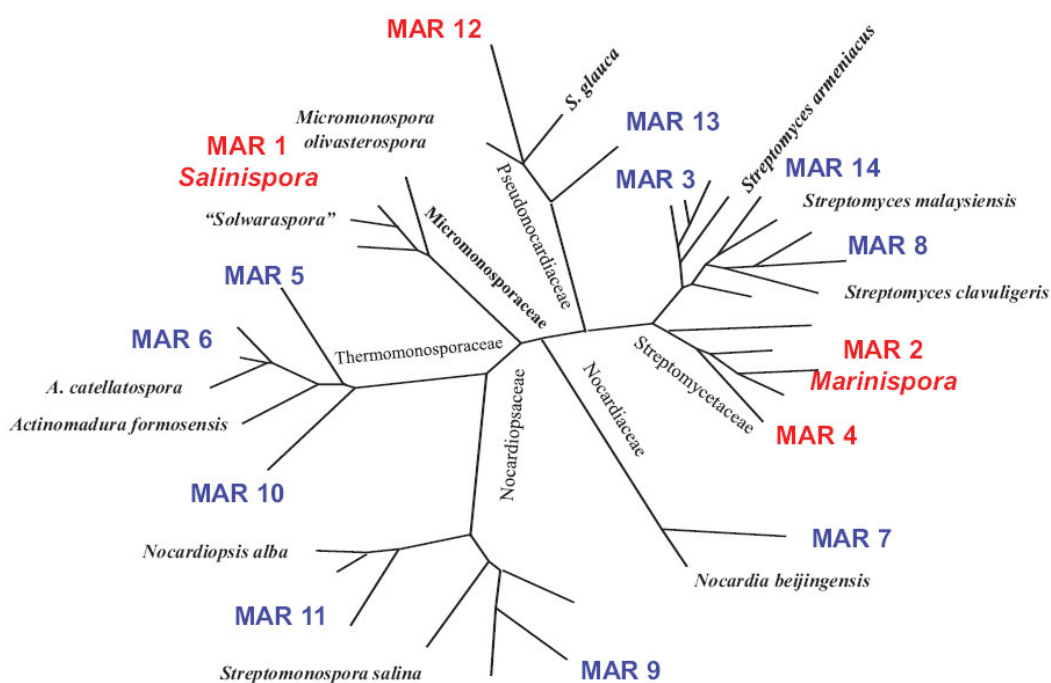
La nieve marina comprende el detritus que va sedimentando gradualmente desde la zona fótica hacia la zona afótica marina. A pesar de ser un material rico en materia orgánica los estudios realizados (DeLong *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 2002) no fueron fructíferos y muy pocos de ellos detectaron la presencia de actinomicetos (Grossart *et al.*, 2004)

Los sedimentos son el ambiente predominante de los actinomicetos marinos. La literatura relacionada a actinomicetos de sedimento marino es abundante por lo que con el paso del tiempo se han dado alcances cada vez más significativos con respecto a la abundancia, distribución e identificación de microflora autóctona. De esta manera, las investigaciones muestran una predominancia de los géneros *Streptomyces*,



*Rhodococcus* y *Micromonospora*, posteriormente seguido de otros géneros. (Maldonado *et al.*, 2005)

En los últimos 50 años se desarrollaron una gama de técnicas de cultivo selectivas para el aislamiento de actinomicetos, lo que trajo consigo el aislamiento e identificación de nuevas cepas y nuevas especies con altas potencialidades. Los casos más resaltantes son los relacionados con el descubrimiento de géneros autóctonos de ambientes marinos, como “*Marinispora*”, “*Marinophilus*” y “*Salinispora*” (Figura 5). A su vez estos métodos, complementados con las técnicas moleculares (Maldonado *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004; Magarvey *et al.*, 2004) han permitido estimar, si bien no con un 100% de certeza, la abundancia y biogeografía de ciertos géneros de actinomicetos en diferentes rangos de profundidades.



**Figura 5.** Diversidad filogenética de actinomicetos marinos indígenas, dividido en 13 grupos que comprenden 6 familias diferentes. Tomado de W. Fenical, P. Jensen, *Nature Chem. Biol.* 2006. 2, 666.


## 2.4 Compuestos bioactivos producidos por actinomicetos marinos

Los determinantes ambientales a los que los actinomicetos marinos han tenido que adaptarse durante su evolución varían desde una alta presión, condiciones de anaerobiosis y temperaturas cercanas a los 0°C como en los fondos marinos, hasta condiciones altamente ácidas y de altas temperaturas como en las fuentes hidrotermales (Lam, 2006). La adaptación de estos microorganismos al ambiente está reflejada tanto en su diversidad metabólica como genética y es así que, en los últimos cuarenta años, grupos de investigación de diversas partes del mundo han podido identificar nuevos compuestos de actinomicetos marinos con excelentes potencialidades, que los diferencian sustancialmente de sus homólogos terrestres (Tabla 1).


**Tabla 1.** Nuevos metabolitos producidos por actinomicetos marinos durante el periodo 2003 – 2005 (Adaptado de Lam, 2006).

Compuesto	Fuente	Actividad
Abisomicina	<i>Verrucosisspora sp.</i>	Ab
Aureoverticililactam	<i>Streptomyces aureoverticilatus</i>	Ac
Bonactina	<i>Streptomyces sp.</i>	Ab, Af
Caprolactona	<i>Streptomyces sp.</i>	Ac
Chandrananamicina	<i>Actinomadura sp.</i>	Aa, Ab, Af, Ac
Chinikomicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Ac
Cloro-dihidroquinonas	Nuevo actinomiceto	Ab, Ac
Diazepinomicina	<i>Micromonospora sp.</i>	Ab, Ac, Ai
Indoles 3,6 disustituidos	<i>Streptomyces sp.</i>	Ac
Frigociclinona	<i>Streptomyces griseus</i>	Ab
Glaciapirrol	<i>Streptomyces sp.</i>	Ab
Gutingimicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Ab
Helquinolina	<i>Janibacter limosus</i>	Ab
Himalomicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Ab
Lajollamicina	<i>Streptomyces nodosus</i>	Ab
Marinomicina	<i>Marinispora sp.</i>	Ab, Ac
Mechercharmicina	<i>Thermoactinomyces sp.</i>	Ac
Salinosporamida A	<i>Salinispora tropica</i>	Ac
Trioxacarcina	<i>Streptomyces sp.</i>	Ab, Ac, Am

 Ab: Antibacteriana

 Aa: Antialgal

 Ac: Anticancerígena

 Am: Antimalárica

 Af: Antifúngica

Los métodos extensivos de cultivo para aislamiento de actinomicetos marinos conllevaron al aislamiento de cepas autóctonas de ambientes marinos. Estas incluyen especies de los géneros *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium marinum*, *Williamsia maris* y *Verrucosisspora* (Bull *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2005; Stach *et al.*, 2004), a partir de las cuales nuevos compuestos bioactivos se han ido identificando.

Entre los más resaltantes tenemos:

- En el 2004, Charan *et al.* publicaron el hallazgo de la Diazepinomicina, un potente alcaloide de amplio espectro de bioactividad aislado de *Micromonospora sp.* el cual presenta fuerte actividad antibacteriana, antiinflamatoria y antitumoral.
- Ese mismo año, se publicó el aislamiento de la Abissomicina C, un polikétido policíclico producido por una cepa de *Verrucosisspora sp.*, con capacidad antibacteriana, principalmente (Riedlinger *et al.*, 2004).
- Uno de los casos más resaltantes está referido a la producción del compuesto antitumoral Salinosporamida producida por *Salinospora tropica* aislado de sedimento marino (Fenical *et al.*, 2008). Este compuesto es una beta lactona inductora de apoptosis en células de melanoma (Chauhan *et al.*, 2005). La Salinosporamida es el primer compuesto anticancerígeno aislado a partir de un actinomiceto marino obligado.

La bibliografía nos muestra una particularidad de géneros de actinomicetos bioactivos como los previamente mencionados, sin embargo el género microbiano con mayor cantidad de compuestos aislados e identificados a la fecha, no sólo de origen marino sino también terrestre, es *Streptomyces*.

Existen un gran número de reportes de compuestos activos producidos por *Streptomyces* marinos.

A nivel internacional tenemos:

- Okami *et al.* (1976), reportaron la producción del compuesto antitumoral y antimicrobiano Aplasmomicina por *S. griseus* SS-20, aislado de sedimento marino.
- Moore *et al.* (1999) reportaron la producción de Salinamidas A y B (Figura 6) por una cepa de *Streptomyces sp.* marino CNB 091. Estos depsipéptidos bicíclicos funcionan como agentes antiinflamatorios y antibióticos.
- Maskey *et al.* (2003) reportaron el hallazgo de las Himalomicinas A y B, dos potentes quinonas producidas por la cepa de *Streptomyces sp.* marino B6921. Este compuesto mostraba fuerte actividad frente a *Bacillus subtilis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Schumacher *et al.* (2003) reportaron la producción del éster Bonactina por una cepa de *Streptomyces sp.* BD21 aislado de ambientes marinos. Este compuesto mostró actividad frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, así como actividad antifúngica.

- Maskey *et al.* (2004) reportaron la producción de Trioxacarcinas A, B y C por los actinomicetos marinos *Streptomyces ochraceus* y *Streptomyces botropensis*. Estos compuesto muestran actividad frente a bacterias patógenas y a su vez una fuerte actividad antiplasmodial, comparable con la Artemisina, el compuesto antiplasmódico más potente usado en la terapéutica actual.
- Leiva *et al.* (2004) reportaron el aislamiento de 62 cepas de actinomicetos a partir de muestras de sedimentos de lagos y ríos en el sur de Chile. El 82% de las cepas aisladas correspondían al género *Streptomyces*, mientras que el 58% del total de cepas aisladas mostraron actividad frente a *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*.
- Macherla *et al.* (2005) reportaron el hallazgo de tres nuevas pyrrolosesquiterpenos, los Glaciapirroles A, B y C, producidos por la cepa *Streptomyces* NPSOO 8187 de origen marino. Estos compuestos mostraron poseer gran capacidad antibacteriana.
- Sujatha *et al.* (2005), mostraron la producción del antibiótico polikétido denominado SBR 22 producido por una cepa marina de *Streptomyces psomoticus*. Este SBR - 22 mostraba potente actividad frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MR-SA).
- Cho *et al.* (2006) reportaron el descubrimiento de la Azamerona, un meroterpenoide producido por *Streptomyces sp.* de origen marino. Este compuesto es el primer producto natural con un anillo ftalazona.

- Adynariana *et al.* (2006) reportaron la producción de la antraquinona Tetracinomicina D por *Streptomyces corchorusii* AUBN (1)/7, aislada de ambientes marinos. Este compuesto muestra altos niveles de toxicidad frente a células de hepatocarcinoma y gastrocarcinoma, así como una leve actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

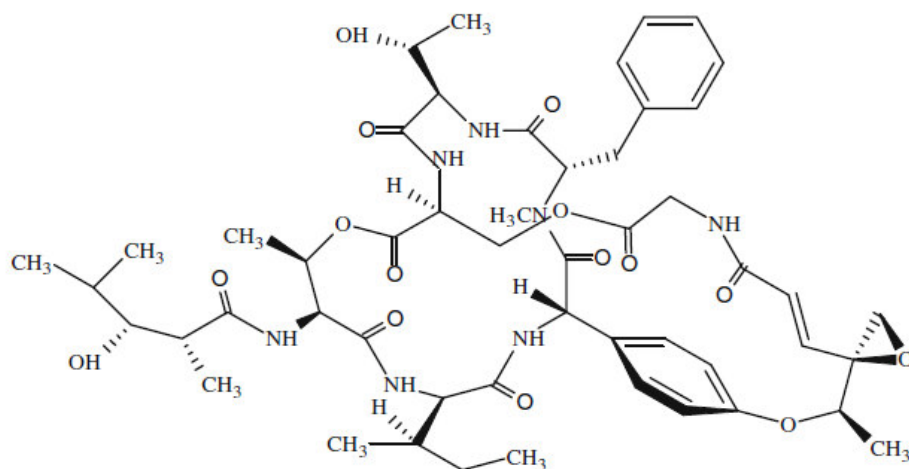


Figura 6. Estructura general de las Salinamidas A y B, potentes péptidos antibacterianos producidos por *Streptomyces sp.* CNB 091

A nivel nacional tenemos:

- En la costa peruana, León *et al.* (2007) reportaron el aislamiento de más de 60 actinomicetos a partir de sedimento, de los cuales más del 80% de los aislados presentaba actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas. Estudios posteriores evidenciaron la actividad antibacteriana de estos microorganismos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* - metilino resistentes y *Enterococcus sp.* - vancomicina resistentes (León *et al.*, 2011), estudio que ratificó el potencial antimicrobiano de los actinomicetos aislados. De estos trabajos resaltó el potencial de una cepa catalogada como M10- 77.

## **2.5 Compuestos bioactivos.- potencial inhibitorio y sinérgico entre moléculas.**

Al estudiar los distintos niveles de organización de la materia viva podemos reconocer a la especie como pieza clave que sostiene la diversidad biológica en nuestro planeta. Sin embargo, si exploramos de manera más profunda veremos que las diferentes formas de vida presentes esconden una enorme diversidad de compuestos químicos, muchos de ellos con propiedades asombrosas.

El siglo XX fue la época de descubrimiento y auge de los compuestos naturales con propiedades antimicrobianas. Antes de este surgimiento, la medicina tradicional y la síntesis química generaban los “preparados” o medicamentos base en la terapia de muchos pacientes frente a diferentes tipos de infecciones. El estudio intensivo de la naturaleza química de plantas y microorganismos trajo consigo el descubrimiento de nuevas moléculas con propiedades antimicrobianas.

El potencial antimicrobiano de los compuestos naturales tiene su base en la naturaleza química del compuesto activo. Esto quiere decir que cada grupo de antimicrobianos, por su genuina y particular estructura química, es capaz de reducir y bloquear rutas metabólicas clave para el crecimiento de un microorganismo particular.

Así, los beta lactámicos son una clase de moléculas caracterizadas por poseer en su estructura un anillo lactámico. Estos antibióticos, entre naturales y semisintéticos, inhiben la síntesis de peptidoglucano y actúan a nivel de las transpeptidasas bacterianas. Los beta lactámicos son un grupo grande de antibióticos que incluye a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenems e inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico y el tazobactam (Martínez & Sánchez, 2007).

Los glucopéptidos como la vancomicina y la teicoplanina están conformados estructuralmente por grandes péptidos complejos los cuales poseen residuos de carbohidratos. Estos antibióticos, a diferencia de los lactámicos, tienen una gran afinidad por los precursores de peptidoglucano, generando una inhibición de la síntesis de peptidoglucano no a nivel enzimático, sino a nivel del residuo D-ala-ala (Martínez & Sánchez, 2007).

A su vez existen otros grupos de antibióticos capaces de inhibir la síntesis de proteínas (aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos y cetólidos), la síntesis de ácidos nucleicos (quinolonas y rifamicinas), la formación de ácidos orgánicos como el ácido fólico (trimetropima y Sulfonamidas), o generan lesiones directas en el ADN y proteínas bacterianas (Nitrofurantoina y Metronidazol, respectivamente) entre otros mecanismos de acción específicos.

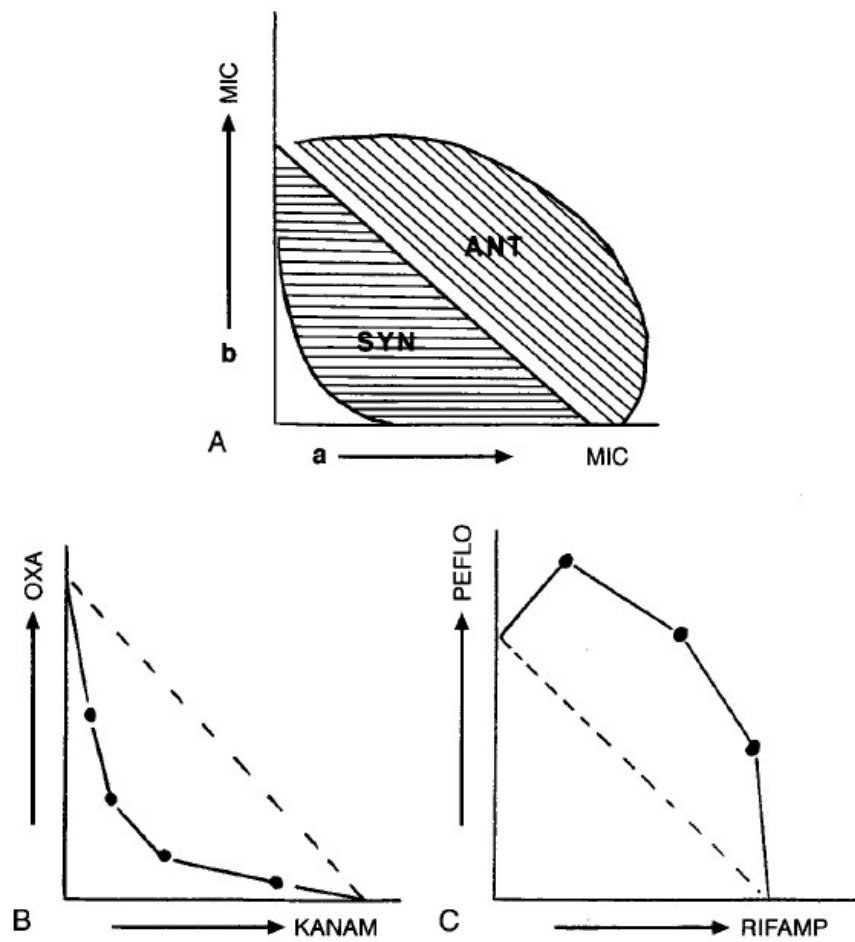


A pesar del continuo descubrimiento de nuevos antibióticos, el problema de las infecciones bacterianas no ha podido ser erradicado. Esto se debe principalmente a que los patógenos han sido capaces de desarrollar mecanismos de resistencia a las drogas usadas convencionalmente en la terapia. Sea de forma natural o adquirida, esta resistencia ha conllevado a la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), *Enterococcus* sp. Resistente a Vancomicina (ERV), *P. aeruginosa* multiresistente y *M. tuberculosis* extra droga resistente (MT – XDR). (Hemaiswarya *et al.*, 2008). Alrededor del 90 – 95% de las cepas de *S. aureus* aisladas a nivel mundial son resistentes a la penicilina (Casal *et al.*, 2005) siendo un 80% resistentes a meticilina en el continente asiático (Chambers, 2001). Además, las cepas de MT – XDR asociadas a enfermedades inmunocomprometidas como el SIDA están asociadas a índices de mortalidad del 50 – 80%, siendo de extrema prioridad el desarrollo de programas de control y tratamiento ligados a este patógeno (OMS, 2004).

Estudios recientes en el campo de agentes antimicrobianos sostienen que ante problemáticas como la alta tasa de resistencia de patógenos bacterianos así como la dificultad de encontrar nuevos antibacterianos de baja toxicidad que sean efectivos contra patógenos multidrogo-resistentes, la búsqueda de nuevos compuestos que a muy bajas concentraciones potencien la actividad de antibióticos ya existentes constituye una alternativa altamente factible (Giamarellou, 1986; Polk, 1999; Lanvin, 2000). Esto implica el concepto de sinergismo entre moléculas con capacidad antibiótica.

El sinergismo es un efecto químico – biológico en el que la acción o efectividad de dos moléculas combinadas es mayor que la suma de la actividad independiente de las mismas (Acar, 2000). Este efecto puede definirse matemáticamente en base a un valor de Concentración Fraccional Inhibitoria (CFI), que equivale a la razón

entre la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del antibiótico individual sobre el CMI de la mezcla potencialmente sinérgica. Si el valor de CFI es  $\leq 0.5$ , se considera como efecto sinérgico (Mackay *et al.*, 2000) (Figura 7).



**Figura 7.** A. Isoblograma que esquematiza la diferencia entre sinergismo y antagonismo de moléculas, basados en la división de valores CMI de los antibióticos probados. B. Ejemplo de sinergismo entre la mezcla de Oxacilina y Kanamicina. C. Ejemplo de antagonismo entre la mezcla de Perfloxacina y Rifampicina. Tomado de Acar (2000).

Los antibióticos sinérgicos son usados en la terapia contra infecciones bacterianas cuando los estudios de antibiograma del patógeno muestran que este posee mecanismos de resistencia específicos. De esta manera, el uso de ácido clavulánico con amoxicilina, ampicilina con sulbactam, y piperacilina con tazobactam constituyen pares de antibióticos sinérgicos usados para combatir cepas patógenas que expresan beta lactamasas (Bush, 1988; Gutmann *et al.*, 1986; Urban *et al.*, 1993).

Se ha reportado también la acción sinérgica entre aminoglucósidos e inhibidores de síntesis de peptidoglucano, ya sea beta lactámicos o glucopéptidos (Moellering & Weinberg, 1971). En este reporte se comenta que la acción sinérgica podría explicarse en base a un aumento de la entrada del aminoglucósido al citoplasma bacteriano, reforzado por la inhibición de la síntesis de pared (Vakulenko & Mobashery, 2003).

Existen otro grupo de compuestos que presentan acción sinérgica contra aquellos microorganismos dependientes de una ruta metabólica esencial para su desarrollo. El uso combinado de Sulfametoxazol con Trimetropina genera una acción combinada contra la síntesis de folatos, importantes intermediarios para la síntesis de bases púricas (Bushby & Hitchings, 1968; Burchall, 1977).

## **2.6 Fraccionamiento biodirigido de metabolitos activos**

Si bien a la fecha se han realizado un sin número de investigaciones relacionadas con las propiedades bioactivas de los compuestos naturales obtenidos de organismos vivos, existe un porcentaje alto de biodiversidad que aún no ha sido

explorado. En estudios relacionados a especies vegetales, se menciona que sólo del 5 – 15% de las plantas superiores han sido investigadas sistemáticamente en busca de compuestos bioactivos, siendo este porcentaje aún menor en estudios relacionados con animales y microorganismos (Cragg *et al.*, 1997).

La diversidad y rareza de la muestra es un factor importante relacionado con la posibilidad de encontrar algún compuesto único y diferente. Según Pieters & Vlietnick (2005), la probabilidad de poder encontrar una sustancia bioactiva puede ser expresada cualitativamente como: “hits” = nº de muestras x biodiversidad de la muestra x nº bioensayos realizados. Esto quiere decir que existe una mayor certeza de poder obtener un compuesto nuevo si analizamos un gran número de muestras de una especie muy exótica, y a su vez realizamos varios bioensayos de actividad. Para lograr este objetivo se han desarrollado diferentes metodologías para el descubrimiento de moléculas bioactivas. Entre estos tenemos (Fabricant & Farnsworth, 2001):

- ❖ Selección aleatoria de muestras y ensayos químicos
- ❖ Selección aleatoria de muestras y ensayos biológicos
- ❖ Selección de muestra basada en reportes de actividad biológica
- ❖ Selección de muestra basado en reportes etnobotánicos.

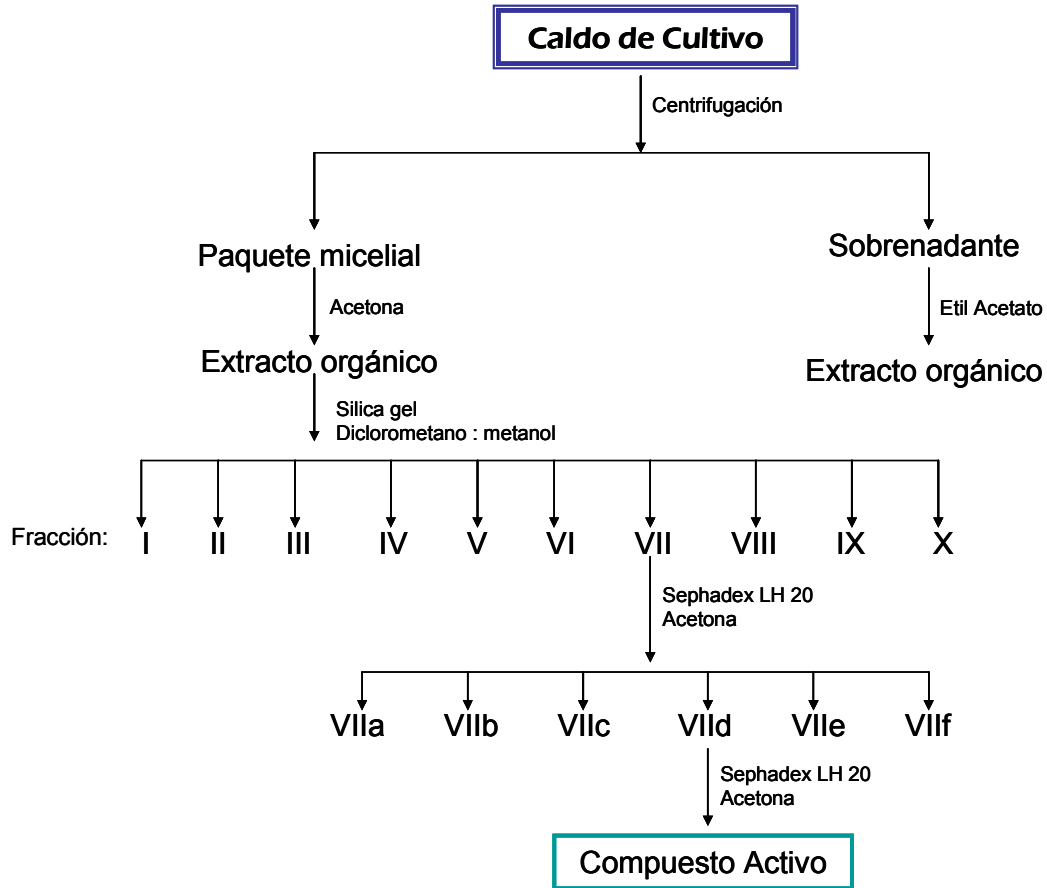
Cada uno de estos alcances tiene sus fortalezas basadas en antecedentes de investigación o en bioensayos recientes de actividad. Sin embargo estos métodos también presentan debilidades siendo la más significativa el grado de aleatoriedad de la prueba, hecho que discrimina un conjunto de moléculas que podría tener alguna actividad deseada.

En base a los antecedentes expuestos previamente emerge el fraccionamiento biodirigido como una alternativa de abarque mayor de los componentes químicos, así como una mayor especificidad de actividad biológica.

El fraccionamiento biodirigido es una técnica que combina diferentes tipos de metodologías de separación de componentes químicos con bioensayos específicos, de manera que por cada paso de separación química el bioensayo permita seleccionar que fracción química es la que brinda la propiedad biológica.

La forma más común de desarrollar un fraccionamiento biodirigido se basa en el uso de solventes orgánicos de diferentes polaridades de manera que estos extraigan los compuestos químicos de diferente naturaleza.

Adinarayana *et al.*, (2007) realizaron el fraccionamiento biodirigido de la resistoflavina, un compuesto citotóxico producido por el actinomiceto marino *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. El esquema del fraccionamiento es mostrado en la Figura 8. En el caso de aislamiento a partir de microorganismos, el autor muestra como primer paso la recolección del sobrenadante y paquete celular producto del proceso fermentativo. El sobrenadante es sometido a una doble extracción con etil acetato, mientras que el paquete micelial es extraído con acetona. A partir de los extractos generados, el autor lleva a cabo una separación por cromatografía en columna de silica gel, usando como mezcla diluyente diclorometano – metanol (95 : 5). Las fracciones generadas son evaluadas por su actividad citotóxica y antibacteriana, y aquellas con bioactividad resaltante son recuperadas para una posterior separación y purificación del compuesto bioactivo.



**Figura 8.** Esquema general del fraccionamiento biodirigido del compuesto citotóxico Resistoflavina.

Adaptado de Adinarayana *et al.*, (2007)

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

“*Streptomyces* M10-77 produce metabolitos extracelulares, algunos de los cuales inhiben el crecimiento bacteriano tanto de patógenos Gram positivos como Gram negativos”.

#### **3.2 Objetivos**

##### **3.2.1 Objetivo General**

1. Evaluar el potencial antibacteriano de los metabolitos extracelulares producidos por el actinomiceto marino *Streptomyces* M10-77.

##### **3.2.2 Objetivos Específicos**

1. Estimar la capacidad antibiótica de *Streptomyces* M10-77 por métodos cualitativos frente a cepas de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, etc.

2. Obtener extractos orgánicos activos a partir de caldos de fermentación de la cepa en estudio.

3. Evaluar el potencial antibacteriano del extracto activo mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Staphylococcus aureus*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, y otros patógenos de importancia en salud pública.

4. Realizar la purificación parcial del extracto activo por métodos cromatográficos.
5. Determinar la capacidad sinérgica de las fracciones obtenidas con antibióticos beta lactámicos y aminoglucósidos.



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico.

- Cepas patógenas MDR de origen clínico como *Escherichia coli* 150, *Pseudomonas aeruginosa* 6141, *Acinetobacter sp.* 134, así como cepas clínicas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus sp.*) proporcionadas por dos hospitales de Lima.
- Cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MR-SA) y *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (VRE), de la colección del Laboratorio de Ecología Microbiana – UNMSM.
- Cepa de *Streptomyces sp.* M10-77, aislada de sedimento marino de la Bahía de Paracas, Ica.

### 4.2 Metodología

#### 4.2.1 Prueba cualitativa de antagonismo mediante el bioensayo de “doble capa”

El actinomiceto marino *Streptomyces* M10-77 fue sometido a pruebas de antibiosis siguiendo la metodología de la doble capa según Westerdahl *et al.* (1991), modificada por León y García – Tello (1998).

Se hizo crecer la cepa de actinomiceto a manera de macrocolonia en placas petri con Agar Marino. Al cabo de siete días las placas fueron sometidas a vapores de cloroformo, y posteriormente se agregó una segunda capa de agar conteniendo un cultivo en fase exponencial de cada cepa testigo. Las cepas testigo fueron *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* 1094, *E. faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus sp.* 239, *P. aeruginosa* 303, *E. coli* 302, *E. aerogenes* 171 y *Acinetobacter sp.* 134.

Las placas se incubaron a 37°C por un periodo de 24 horas, y luego se procedió a la observación de las mismas. Todo halo de inhibición de crecimiento de la cepa testigo se consideró como prueba positiva de actividad antagonista.

#### **4.2.2 Obtención de metabolitos extracelulares**

Este proceso se realizó siguiendo las recomendaciones de Adinarayana *et al.* (2007). Se generaron cultivos iniciadores de la cepa en estudio, inoculándola en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 50 mL de caldo marino suplementado con almidón 1% (p/v) y glucosa 0,5% (p/v). Este matraz se colocó en agitación (*Rotary shaker*, Ika Labortechnik) a 200 rpm por 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se vertió el 10% del volumen total del cultivo iniciador en un matraz Erlenmeyer de 1 L conteniendo 200 mL del medio de fermentación mencionado previamente. Éste se mantuvo en agitación de 200 rpm por 6 días. El sobrenadante fue obtenido utilizando una centrífuga universal (Kossodo) a una velocidad de centrifugación de 5000 rpm por 25 minutos y decantado en recipientes estériles para su procesamiento.

#### **4.2.3 Extracción química de compuestos bioactivos**

El caldo de fermentación obtenido (200 mL) fue sometido a una doble extracción usando solventes orgánicos de diferentes polaridades (diclorometano, acetato de etilo y butanol; solventes Baker). Cada una de las fases orgánicas obtenidas fue concentrada a presión reducida usando un Rotavapor (Buchi) a 50 rpm, a una temperatura de 40 °C. Se obtuvieron como resultado 3 extractos orgánicos de naturaleza sólida, uno por cada solvente, los cuales fueron evaluados en un breve ensayo de difusión en agar para dilucidar en cuál de ellos se encuentra el compuesto antibacteriano. La composición de los diferentes medios de cultivo usados se muestra en el anexo 2.

#### **4.2.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto orgánico activo**

La prueba de CMI fue realizada siguiendo la metodología según Karthy *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Las cepas testigo fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (resistente a meticilina), *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (resistente a vancomicina), y las cepas de origen clínico *Pseudomonas aeruginosa* 6141, *Escherichia coli* 150 y *Acinetobacter sp.*134.

Las cepas fueron mantenidas en Caldo Tripticasa Soya (TSB, Oxoid) con crecimiento a 37°C de incubación. A partir de un cultivo en fase exponencial se preparó una suspensión bacteriana compatible con la escala 0,5 Mc Farland. El extracto orgánico fue resuspendido en DMSO (Merck) al 5% para obtener una solución stock de 2 mg/ml de cada extracto. Se prepararon diluciones 1:2 de dicha suspensión, aplicando 0.05 mL de cada una en los pocillos de micro dilución (Microplacas *Pure Grade*; Brand). Posteriormente, 0.04 mL de Caldo Tripticasa Soya 2X (doble concentración) se vertieron y se mezclaron con la suspensión de prueba. Finalmente, 0.01 mL de la suspensión bacteriana fue vertida en cada uno de los pocillos. Las pruebas se realizaron por duplicado.

El material fue puesto en incubación a 37°C por 18 – 24 horas. Transcurrido el tiempo se vertió 0.04 mL de Cloruro 2, 3, 5 - Trifenil Tetrazolio (TTC; 5 mg/mL) en cada uno de los pocillos, y se colocó nuevamente en incubación por 20 minutos. El viraje del color del medio a rojo fue considerado como indicativo de crecimiento microbiano. Se tomó como el valor de la CMI a la menor concentración de extracto en la que no hubo crecimiento. Se usó como control negativo el disolvente sin añadidura de extracto y como controles positivos, antibióticos de referencia.

Se realizó paralelamente la determinación de CMI del extracto activo y de antibióticos de referencia frente a la cepa *S. aureus* ATCC 43300 (resistente a

metilicina), con el objetivo de poder comparar el poder bactericida del extracto. Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo la metodología para determinación de CMI previamente descrita. Los pasos descritos con anterioridad se ven resumidos en el anexo 1.

#### **4.2.5 Localización tentativa del metabolito activo por bioautografía**

Con el objetivo de buscar una localización tentativa del metabolito activo dentro del extracto, se realizó un ensayo de bioautografía (Adikaram & Bandara, 1998) usando una placa de sílica gel (Merck) con el extracto separado por cromatografía en capa fina (sistema de solventes metanol 95 : diclorometano 5). La placa de cromatografía se colocó en la base de una placa con agar Trypticase Soya (TSA, Oxoid) y sobre este se vertió 10 mL de TSA semisólido conteniendo un cultivo fresco de *Pseudomonas aeruginosa* 6141. Se dejó en incubación a 37°C por 18 horas de manera que se puedan observar las zonas de inhibición.

#### **4.2.6 Fraccionamiento parcial del extracto activo por cromatografía en columna**

Se repitió el proceso fermentativo hasta obtener aproximadamente 10 L de sobrenadante del cultivo, los cuales fueron procesados químicamente para la obtención de extracto orgánico activo, siguiendo la metodología previamente descrita.

El extracto fue separado mediante la técnica de cromatografía en columna. Se utilizó una columna de vidrio de 2,5 x 35 cm, en la que se colocó una mezcla acuosa de sílica gel (15g) Kieselgel (Merck) 0,063 – 0,200 mm. La fase móvil estuvo constituida inicialmente por diclorometano: éter de petróleo (9:1), al que le continuaron mezclas de polaridad creciente. La aparición de los compuestos

separados fue evidenciada en placas de cromatografía en capa fina (TLC, por sus iniciales en inglés *thin layer chromatography*) en sistemas de solventes diclorometano: metanol (95:5).

Los compuestos presentes en el extracto activo fueron observados mediante la preparación de placas de TLC, y fueron posteriormente agrupados en 4 fracciones principales según polaridad. Se realizó una placa cromatográfica resumen para evidenciar los compuestos pertenecientes a cada fracción. Finalmente el peso de cada fracción fue registrado para conocer la proporción que constituyen del extracto total. Se llevó a cabo la prueba de CMI con las cuatro fracciones obtenidas, siguiendo la metodología previamente descrita.

#### **4.2.7 Bioensayo de sinergismo con antibióticos referenciales**

Obtenido los valores de CMI, las fracciones fueron diluidas a 1:4 del valor CMI de manera que en la prueba siguiente no ejerzan actividad bactericida. Para esta prueba se obtuvieron antibióticos purificados en polvo de las familias de beta lactámicos (Bencil penicilina, Ceftriaxona y Cefotaxima) y aminoglucósidos (Estreptomicina y Gentamicina). Siguiendo las recomendaciones de Fukumoto *et al.* (2008), se realizó la prueba de CMI para cada antibiótico de referencia, comparando paralelamente dicho valor con el valor CMI de la mezcla de cada antibiótico con cada fracción orgánica a concentraciones no bactericidas (1/4 CMI). Las pruebas se realizaron por duplicado. A partir de estos resultados se generó el valor de la concentración inhibitoria fraccionaria (FIC, por sus siglas en inglés *Fractional inhibitory concentration*), que consiste en el cociente del valor CMI de la mezcla antibiótico-fracción sobre el valor CMI del antibiótico. Se consideró sinergismo entre compuestos cuando el valor FIC sea menor de 0,5. La cepa de prueba para este bioensayo fue *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA).

#### **4.2.8 Caracterización morfológica de la cepa en estudio**

La cepa M10-77 fue sembrada en medios recomendados para la caracterización morfológica de actinomicetos (ISP 3, 4, y 5) para observar sus características culturales (Higginbotham & Murphy, 2010). Estas descripciones fueron acompañadas de coloración Gram y microcultivo.

## 5. RESULTADOS

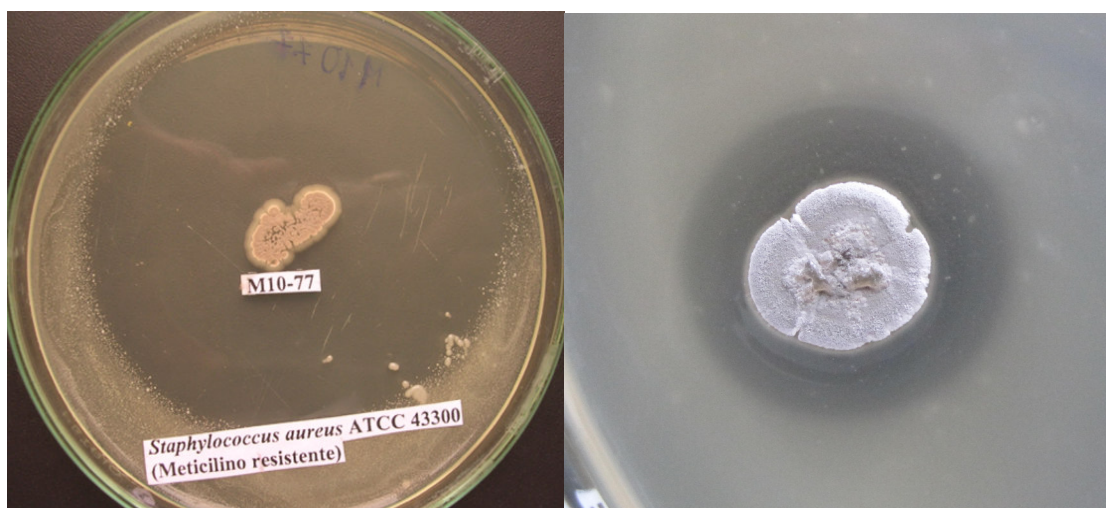
### 5.1 Prueba cualitativa de antagonismo mediante el bioensayo de “doble capa”

Los resultados del ensayo cualitativo por el método de “doble capa” pueden apreciarse en las Tabla 2. Los resultados muestran una predisposición inhibitoria marcada contra las cepas Gram positivas, formando grandes halos de inhibición que llegan a los 70 mm de diámetro (Figura 9).

**Tabla 2.** Actividad inhibitoria de *Streptomyces* M10-77 frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos, por el método de doble capa.

Patógeno	Halo de Inhibición (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	+++++
<i>S. aureus</i> 1094	+++++
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	+++++
<i>Enterococcus</i> sp. 239	++++
<i>P. aeruginosa</i> 303	+++
<i>E. coli</i> 302	++
<i>E. aerogenes</i> 171	++
<i>Acinetobacter</i> sp. 134	++

+: 1 – 15mm ; ++: 16 – 30mm ; +++: 31 – 45mm ;  
++++: 46 – 60mm ; +++++: >60mm

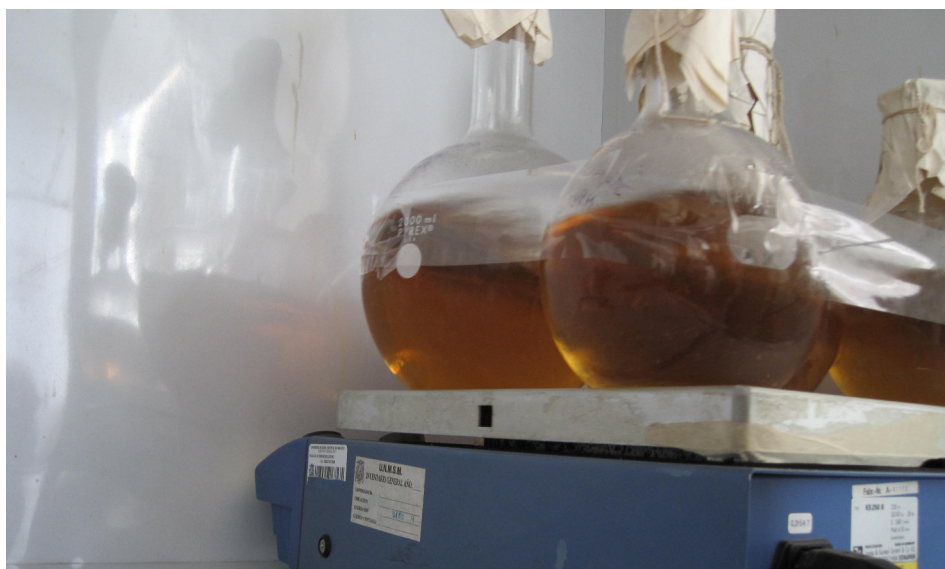


**Figura 9.** Actividad inhibitoria por el método de doble capa. La actividad frente a bacterias Gram positivas (Izquierda) es mucho más notoria que frente a bacterias Gram negativas (Derecha).

## 5.2 Obtención de metabolitos extracelulares

El proceso fermentativo realizado para *Streptomyces* M10-77 fue exitoso, pues de pequeños volúmenes se pudo obtener extracto suficiente para el desarrollo de las pruebas cuantitativas (Figura 10). Tanto los componentes del medio de cultivo como los parámetros de crecimiento fueron piezas importantes para que se lleve a cabo un proceso fermentativo óptimo.





**Figura 10.** Cultivo de *Streptomyces* M10-77 en agitación.

### **5.3 Extracción química de compuestos activos**

Así mismo, de la extracción con solventes orgánicos se pudo evidenciar que para la cepa seleccionada, el diclorometano resultó ser el solvente que capturó de manera más eficiente los compuestos antimicrobianos, hecho ratificado en el ensayos de actividad en placa (Figura 11). Los extractos butanólico, etil acético y acuoso no mostraron actividad frente a la cepa de prueba *S. aureus* ATCC 43300.

De esta manera, se concluyó que el diclorometano es el solvente orgánico con mayor tasa de captura de metabolitos activos para el sobrenadante de la cepa en estudio. Las pruebas siguientes de índole química y biológica fueron realizadas a partir de este extracto activo.

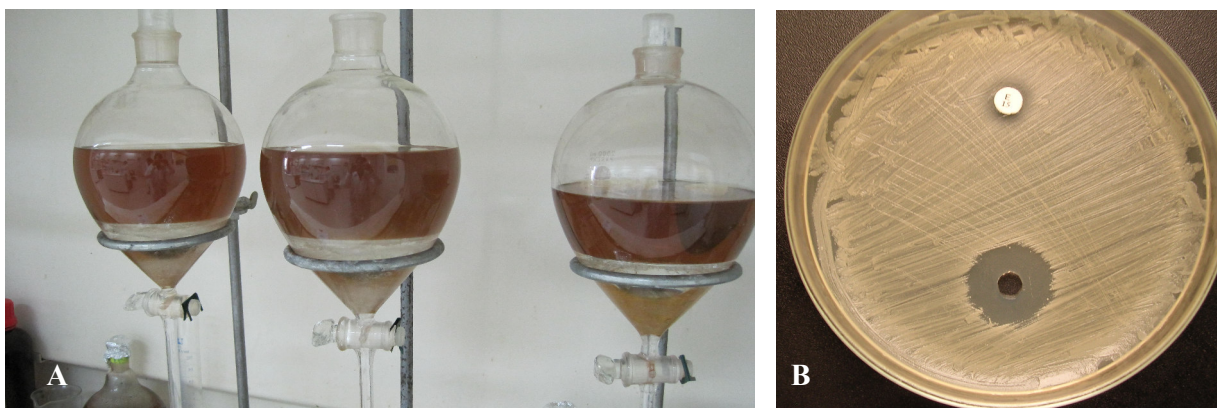


Figura 11. A. Proceso de extracción usando solventes orgánicos de diferentes polaridad. B. Ensayo preliminar de actividad de los extractos obtenidos. En la placa se muestra la inhibición generada por el extracto diclorometanólico de *Streptomyces* M10-77 en comparación con un disco de Eritromicina.

#### 5.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto orgánico activo

Los resultados del ensayo cuantitativo del CMI del extracto diclorometanólico de *Streptomyces* M10-77 pueden observarse en la Tabla 3. Estos valores reflejan una síntesis de lo apreciado en la prueba de doble capa: una potente actividad de los metabolitos extracelulares frente a bacterias patógenas, tanto en cepas de referencia como en cepas de origen clínico.

**Tabla 3.** Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto diclorometánico de *Streptomyces* M10-77 frente a bacterias multi-drogo resistentes.

	CMI (µg/mL)
<b>Cepas de referencia</b>	
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 MRSA	7,9
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 VRE	31,7
<b>Cepas de origen clínico</b>	
<i>E. coli</i> 150	250
<i>P. aeruginosa</i> 6141	62,5
<i>Acinetobacter</i> sp 134	62,5

VRE: Resistencia a Vancomicina

MRSA: Resistencia a Metilicina

\* *E. coli* resistente a Cefuroxima, Ceftazidima, Cefepime, Aztreonam, Amoxicilina, Ampicilina + ac.

Sulbactam, Sulfatrimetropín y Ciprofloxacina; Sensibilidad a Cloranfenicol, Meropenem y Amikacina.

\**Acinetobacter* resistente a Cefuroxima, Ceftazidima, Cefepime, Aztreonam, Tetraciclina, Amoxicilina, Ampicilina + ac. Sulbactam y Meropenem; Sensibilidad a Ciprofloxacina, Sulfatrimetropín, Amikacina y Cloranfenicol.

\**Pseudomonas* resistente a Amikacina, Aztreonam, Cefalexina, Cefuroxima, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Meropenem, Gentamicina, Sulfametropim y Piperazilina + Tazobactam

Para corroborar la efectividad del extracto diclorometanólico de *Streptomyces* M10-77 frente a cepas Gram positivas, se determinó la CMI de dicho extracto frente a bacterias Gram positivas de origen clínico. Los resultados son mostrados en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de la cepa M10-77 frente a patógenos Gram positivos de origen clínico.

	CMI (µg/ml)
<i>Staphylococcus</i> sp. 1094	3.9
<i>S. epidermidis</i> 1093	15.7
<i>S. aureus</i> MDR	1.9
<i>S. saprophyticus</i> 7694	1.9
<i>Streptococcus</i> sp. 7751	0.9
<i>Enterococcus</i> sp. 7471	62.5

Los controles de antibióticos nos permitieron reconocer la fuerte actividad del extracto diclorometánico de M10-77, evidenciando que los valores CMI entre el extracto y los antibióticos son muy cercanos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Comparación de los valores CMI de antibióticos de referencia con el valor obtenido por el extracto de M10-77. frente a la cepa de *S. aureus* ATCC 43300 MR-SA.

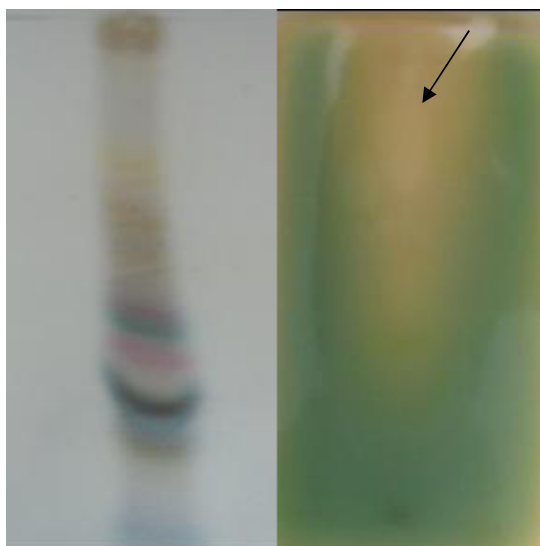
	<u>CMI (µg/mL)</u>
Cefotaxima	3,9
Ceftriaxona	7,9
Bencil penicilina	3,9
Estreptomina	15,8
<b>Extracto M10-77</b>	<b>7,9</b>

### 5.5 Localización tentativa del metabolito activo por bioautografía

Se realizó una cromatografía en capa fina para visualizar la cantidad de componentes químicos presentes en el extracto. La cromatografía, vista en la Figura 8, muestra aproximadamente 10 compuestos, sin embargo debemos tener en cuenta que en la placa de silica gel podría encontrarse compuestos superpuestos, hecho que de ser así aumentaría el número de compuestos presentes.

Con respecto a los resultados de la bioautografía, la placa no muestra una zona particular que pueda relacionarse con un valor de R<sub>f</sub> específico, por el contrario, casi toda la corrida cromatográfica muestra zonas de inhibición. Esto anula

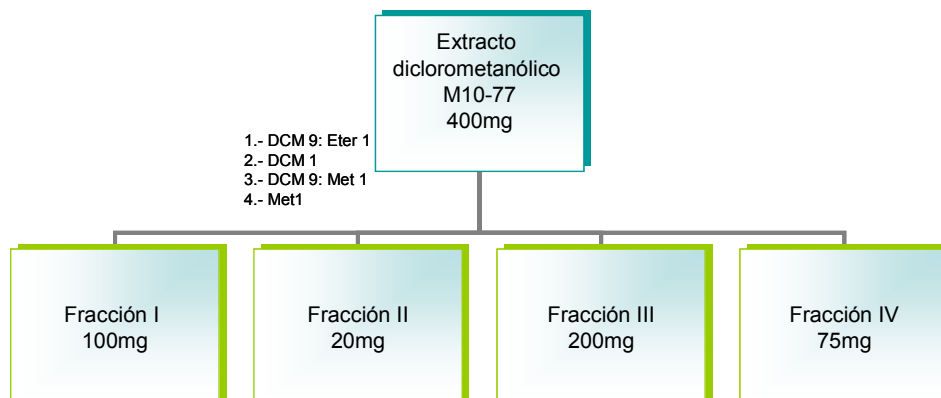
presuntivamente la premisa de la existencia de un único metabolito activo y por su parte sugiere la presencia de dos o más compuestos antibacterianos. Este hecho motiva entonces a continuar con el fraccionamiento biodirigido de los metabolitos antibacterianos.



**Figura 12.** Izquierda: Corrida cromatográfica del extracto activo en una placa de sílica gel. Derecha: Imágenes del ensayo de bioautografía frente a *P. aeruginosa* 6141. La flecha señala una zona superior clara que es la zona de inhibición.

### 5.6 Fraccionamiento parcial del extracto activo por cromatografía en columna

La purificación parcial de extracto de M10-77 permitió obtener 4 fracciones activas (Figura 13). Al comparar los valores CMI obtenidos de las fracciones con la placa cromatográfica resumen podemos afirmar que el extracto activo presenta más de un compuesto con capacidad inhibitoria (Figura 14). Este resultado motiva mucho a la investigación al poder apreciar la gran capacidad biosintética que presentan los actinomicetos marinos.



**Figura 13.** Modelo del proceso de cromatografía en columna seguido para la separación del extracto de M10-77 en fracciones orgánicas.



**Figura 14.-** Placa cromatográfica resumen del las fracciones obtenidas.

**Tabla 6.** Valores CMI de las fracciones obtenidas frente a *S. aureus* ATCC 43300 MR-SA

	<u>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</u>
Fracción I	15,8
Fracción II	125
Fracción III	31,3
Fracción IV	31,3

Al observar los valores CMI de cada fracción (Tabla 6) y lo compararlos con el valor del extracto total, podemos observar que los valores han disminuido. Esto nos lleva a pensar que entre la totalidad de compuestos vistos en la placa cromatográfica resumen (Figura 14) existe una cierta dependencia para magnificar el poder bactericida del extracto. Esto se encuentra directamente ligado con la capacidad sinérgica de compuestos antimicrobianos, los cuales pueden favorecer potenciando

la actividad de uno de los compuestos presentes en el extracto, o bien eliminando algunos de los mecanismos de resistencia presentes en la bacteria testigo. A partir de esta afirmación deducimos que si es que se diera el caso de un posible sinergismo, este podría aplicarse muy probablemente a algunas familias de antibióticos de referencia, como beta lactámicos, aminoglucósidos, glucopéptidos, entre otros. Este hecho, sumado a las evidencias de biosíntesis de diversos compuestos por la cepa M10-77 motivó a realizar el bioensayo de sinergismo.

### 5.7 Bioensayo de sinergismo con antibióticos referenciales

Las 4 fracciones obtenidas fueron ensayadas para evaluar su capacidad sinérgica, de las cuales sólo la fracción II mostró resultados positivos. Los resultados del ensayo de sinergismo de la fracción II se muestran en la Tabla 7.

Los valores de concentración fraccionaria inhibitoria (FIC) son menores de 0,5 para los casos ensayados, combinando la fracción II con antibióticos beta lactámicos y aminoglucósidos.

**Tabla 7.-** Resultados de la actividad sinérgica de la fracción II de M10-77 con antibióticos de referencia.

	CMI (ug/ml)		Radio	FIC
	Ab	Ab + F II		
<b>Antibióticos beta lactámicos</b>				
Bencil penicilina	3,9	<0,03	128	0,008
Cefotaxima	3,9	0,12	32	0,031
Ceftriaxona	7,9	0,24	32	0,031
<b>Antibióticos aminoglucósidos</b>				
E streptomina	15,8	3,9	4	0,250
Gentamicina	>2000	250	8	0,125

\*Ab: Antibiótico

\*Ab + F II: Antibiótico más fracción II a concentración no bactericida

\*Radio: Grado de mejora de la actividad del antibiótico

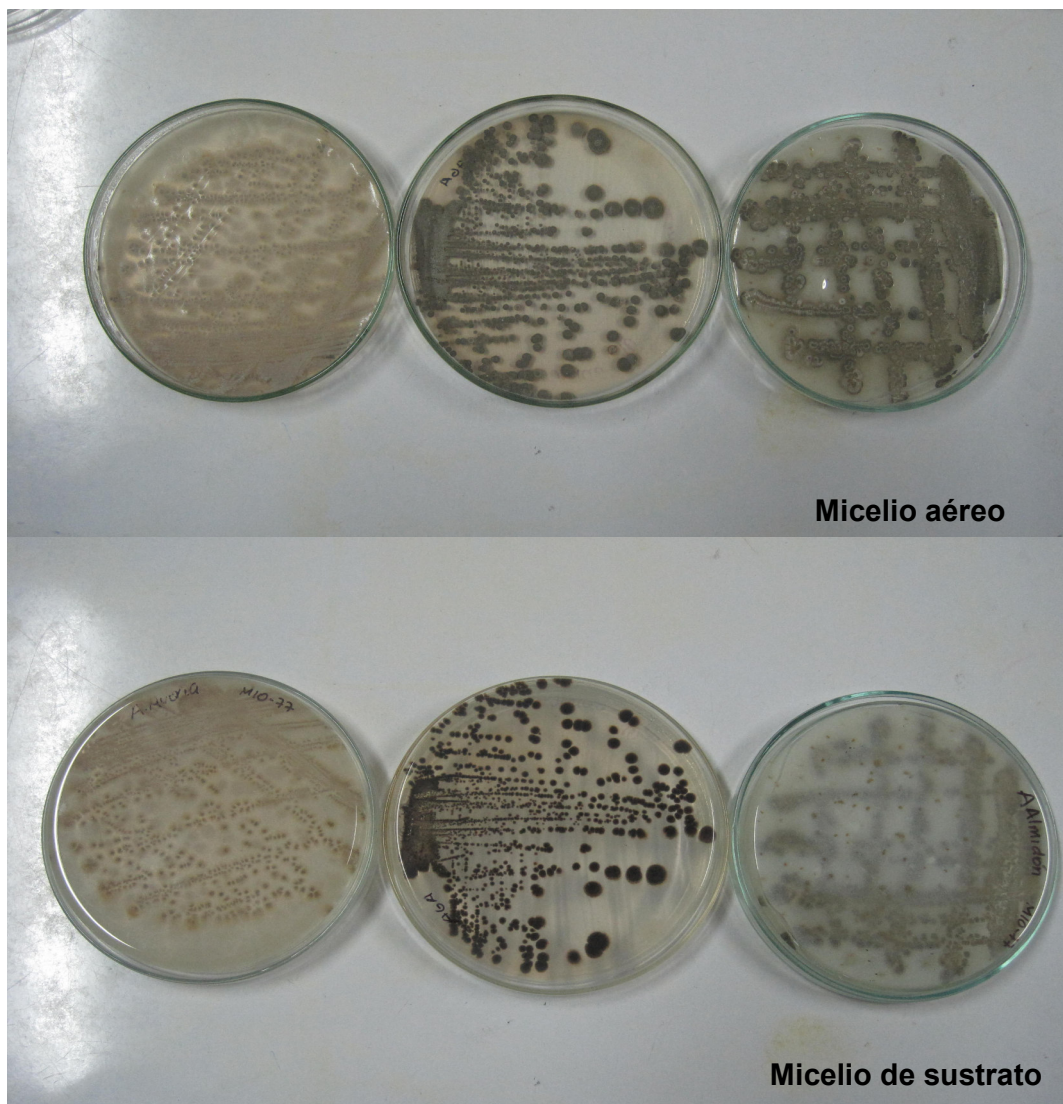
\*FIC : Concentración Inhibitoria fraccionaria (si FIC <0.5 existe sinergismo)

## 5.8 Caracterización morfológica de la cepa en estudio

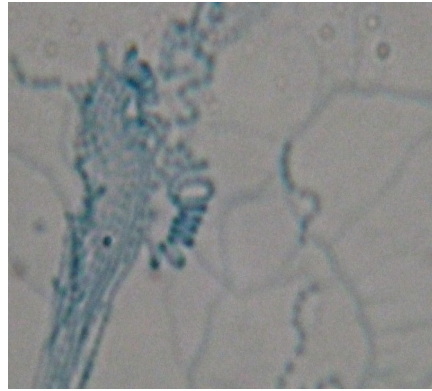
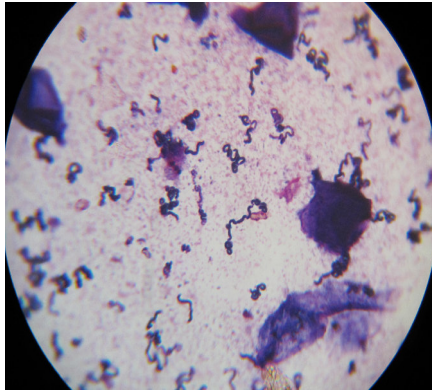
Finalmente, la cepa fue cultivada en medios para actinomicetos y, en base a sus características culturales, tinción Gram y microcultivo (Figura 16) se pudo determinar que la cepa pertenece al género *Streptomyces*.

La siembra en los medios ISP sirvió para reportar algunas características básicas como la coloración del micelio aéreo, micelio de sustrato, y la formación de algún pigmento difusible (Figura 15). Sin embargo, dichos resultados no fueron relevantes para la determinación de la especie.





**Figura 15.** *Streptomyces* M10-77 en medios ISP. Izq: Agar Avena (ISP3), Cen: Agar Glicerol Asparagina (ISP5), Der: Agar Almidón Sales Inorgánicas (ISP4)



**Figura 16.** Formas microscópicas en espiral típicas del género *Streptomyces*, encontradas en la cepa M10-77 usando la tinción Gram (Izq) y microcultivo (Der).

## 6. DISCUSION

*Streptomyces* M10-77 es una cepa adaptada a las condiciones del ambiente marino, esto quiere decir que posee una fisiología acorde para su correcto desarrollo y expresión de metabolitos primarios y secundarios.

El método de doble capa constituyó una prueba muy sensible y efectiva para la evaluación cualitativa de antagonismo bacteriano. En el trabajo de León *et al.*, (2007) se utiliza este método como *ensayos* de una gran colección de cepas ante dos bacterias testigo, obteniendo buenos resultados. Si bien en el presente trabajo las evaluaciones se realizaron con cepas estándar y de origen clínico, podemos comparar los resultados obtenidos con aquellos del trabajo previamente mencionado donde se evaluaron más de 50 cepas de actinomicetos. Entre ambos resultados se observa la marcada actividad frente a organismos Gram positivos y una mediana o tenue actividad frente a bacterias Gram negativas. Esto puede deberse o bien a la selección adaptativa de producción de antibióticos eficaces frente a microorganismos ecológica y filogenéticamente relacionados (Challis & Hopwood, 2003) o bien a que las bacterias Gram negativas poseen eficientes mecanismos de resistencia que neutralizan la acción de los antibacterianos producidos por actinomicetos. Haste *et al.*, (2010) muestra la producción de etamicina por la cepa de actinomiceto marino CNS-575, y a partir de sus resultados muestra que la actividad del antibiótico purificado es muy potente frente a cepas de *S. aureus*, y reducida frente a cepas como *P. aeruginosa* o *Salmonella*.

El hecho que *Streptomyces* M10-77 presente actividad antibacteriana frente a Gram positivos y Gram negativos permite plantear la interrogante sobre la producción por parte de la cepa de un metabolito de amplio espectro, o bien de dos o más antibacterianos con acción dirigida y específica hacia cada grupo microbiano.

El fraccionamiento biodirigido es una técnica que permite obtener, de manera total o parcial, la separación de los compuestos antimicrobianos de la cepa en estudio. En el extracto orgánico que concentre a los metabolitos activos.

Se usaron dos solventes orgánicos de polaridad alta (n – butanol) y polaridad mediana (diclorometano) para la extracción orgánica. Este procedimiento permitió la separación de los compuestos polares extracelulares producidos por *Streptomyces* M10-77. El diclorometano fue el solvente con mayor eficiencia de recuperación de antibacterianos del sobrenadante. Si bien muchos trabajos recomiendan usar Etil Acetato para la extracción de metabolitos, esta vez el Diclorometano fue el solvente elegido. Ambos son solventes considerados medianamente polares, sin embargo debemos considerar las diferencia entre el momento dipolar, conformación geométrica y su constante dieléctrica. El Diclorometano fue escogido por sus características químicas así como por su reducido costo y fácil obtención en comparación con el Etil Acetato.

Con respecto al proceso fermentativo, debe hacerse la aclaración que los objetivos de la presente tesis no contemplaban la optimización de este proceso en un medio definido. Sin embargo la revisión de la literatura (Sujatha *et al.*, 2005; Adinarayana *et al.*, 2007; Haste *et al.*; 2010) permitió plantear una modificación del caldo marino que generó un rendimiento considerable a las condiciones de agitación y temperatura. Los medios de fermentación para actinomicetos son generalmente más enriquecidos que los de aislamiento y tienen una variedad de nutrientes naturales y semisintéticos. En este caso particular los medios de fermentación poseen grandes cantidades de fuente carbonada, cloruro de sodio, sales minerales propias del agua de mar, una fuente proteica y debe estar enriquecida con algún cierto grupo de aminoácidos como Asparagina, Arginina o Fenilalanina. Estos medios generan una gran biomasa que conlleva a la producción de los metabolitos secundarios generalmente a partir del

tercer o cuarto día. La bibliografía muestra que el tiempo de agitación es esencial para la obtención de buenas cantidades de metabolitos. Por estas razones es que se estandarizó el proceso fermentativo usando caldo marino modificado (Anexo 2) puesto a temperatura ambiente por 7 días de agitación.

A partir del proceso fermentativo por repetición del cultivo de *Streptomyces* M10-77 en frascos Erlenmeyer (10L de fermentación) se obtuvieron 480 mg de muestra, lo que nos lleva a un rendimiento de 48 mg / L. En los trabajos de Williams *et al.* (2007) y Asolkar *et al.* (2009), se muestran rendimientos mayores que los obtenidos en la presente trabajo, por lo que podemos afirmar que la optimización de los parámetros fermentativos es necesaria si se desea un mayor rendimiento en la obtención de extractos orgánicos.

La obtención del extracto diclorometánico a partir del proceso fermentativo permitió realizar las evaluaciones cuantitativas del potencial antibacteriano de la cepa en estudio. Los resultados muestran una gran potencia del extracto diclorometanólico sobre las bacterias Gram positivas, especialmente contra la cepa de *S. aureus* meticilino resistente. En la Tabla 5 se muestra los valores de CMI de diferentes antibióticos convencionales muestra mucha similitud con el valor obtenido del extracto. Teniendo en cuenta que se trata de un extracto de compuestos y no un antibacteriano purificado podríamos considerar que el compuesto presente en este extracto presenta alto potencial para ser aplicado en la antibioticoterapia frente a patógenos Gram positivos drogo-resistentes; esto nos lleva a proyectar los estudios hacia la búsqueda de nuevos antibióticos contra bacterias de la magnitud de *S. aureus* meticilino resistentes, *Enterococcus sp.* vancomicina resistentes, *Streptococcus* MDR e incluso contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* extra-drogo resistente (XDR).

El ensayo de bioautografía tenía el objetivo de obtener la localización presuntiva del metabolito antibacteriano. Este paso permitiría reconocer cuál de las bandas mostradas en la cromatografía en capa fina es la bioactiva. El resultado fue contundente, mostrando que el bloque de bandas separadas presentaba la capacidad de inhibir el cultivo testigo.

Los actinomicetos se caracterizan por ser grandes productores de antibióticos y de otros metabolitos secundarios. El estudio del genoma completo de *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces avermitilis*, los dos únicos genomas de especies de *Streptomyces* secuenciados a la fecha (Hsiao & Kirby, 2008), son muestra que este género microbiano posee múltiples *clusters* para la producción de antibióticos, asociados tanto al cromosoma como a los plásmidos en su interior. Este hecho verifica la premisa que los actinomicetos tenga la capacidad de expresión de múltiples antibióticos de manera constitutiva o inducida. En el caso de la cepa en estudio, la bioautografía corrobora la producción múltiple de metabolitos antibacterianos, por lo que se deduce que los pasos subsiguientes de fraccionamiento biodirigido deben ser muy precisos para el correcto aislamiento de los metabolitos antibacterianos.

El desarrollo del sistema de solventes usado en la cromatografía en columna obedece a la optimización del sistema de cromatografía ensayado en pasos previos durante la cromatografía en capa fina (TLC). De este modo, el diclorometano constituyó el solvente principal para el proceso de separación. La cromatografía en capa fina mostró al inicio de la corrida una agrupación de aproximadamente 10 compuestos, seguidos por otros más separados que siguieron el rastro de la mezcla de solventes (diclorometano 95 : metanol 5). Según el principio de competencia entre la fase estacionaria y la fase móvil del TLC, los resultados reflejan la presencia de compuestos de alta y mediana polaridad en el extracto activo, dato que perfila al grupo de solventes a usarse en la cromatografía en columna como mezclas medianamente

polares. Es de esta manera que la primera mezcla de solventes usados constituye una mezcla de diclorometano-éter (9:1), seguido luego de mezclas con polaridad creciente.

La placa resumen de la cromatografía en columna muestra más de una docena de compuestos presentes en el extracto activo. Los compuestos de mediana polaridad pudieron ser separados de manera más eficaz y agrupados en las fracciones I – III. Por otro lado, el mayor conjunto de compuestos se agruparon en la una de las fracciones más polares (III) que presenta alrededor de 6 compuestos. Este hecho nos permite concluir que la cromatografía en capa fina nos muestra los compuestos más abundantes de la muestra mientras que los otros compuestos permanecieron superpuestos en la placa de sílica gel.

La cromatografía en columna permitió obtener cuatro fracciones, siendo la fracción III la más abundante (200 mg) y la fracción II la menos abundante (20 mg). La naturaleza de la muestra conllevaba a un fraccionamiento más exhaustivo, especialmente con la fracción III que contiene la mayor cantidad de compuestos.

A pesar de ser la fracción con el menor peso y número de compuestos (20 mg y dos compuestos aproximadamente) la fracción II fue la única que mostró capacidad sinérgica con los antibióticos referenciales usados frente a la cepa testigo *S. aureus* ATCC 43300.

En los últimos años ha habido un realce por la búsqueda de nuevos sinérgicos para antibióticos de referencia. Uno de los ampliamente conocidos en la antibioticoterapia es el ácido clavulánico, producido por el actinomiceto *Streptomyces clavigerus*. Este inhibidor de beta lactamasas es usado frecuente junto a la amoxicilina, un semisintético derivado de la penicilina.

Podemos analizar la naturaleza del compuesto sinergista en base al antibiótico que ha sido mezclado y al perfil de resistencia que presenta la cepa testigo. En el caso particular de *S. aureus* ATCC 43300, es una cepa que presenta el gen *mecA* de resistencia a meticilina. Este gen le confiere resistencia a la meticilina así como a otros antibióticos betalactámicos, debido a las proteínas de unión a penicilina (proteínas PBP) que este microorganismo expresa (Gil, 2000).

Existen diferentes estudios que muestran la acción de nuevas drogas eficaces sobre cepas de *S. aureus* resistente a meticilina y de su posible acción sinergista con otros grupos de antibióticos. De esta manera, Mainardi (1997), muestra un resumen con las principales combinaciones de antibióticos que combaten de manera efectiva las infecciones por *S. aureus*. Así, comenta que por lo general la mezclas sinérgicas de glucopéptidos y betalactámicos presentan una acción bacteriostática y bactericida frente a cepas de *Staphylococcus* resistentes a meticilina. Entre otras mezclas sinérgicas con acción bactericida hacen referencia uso de las estreptograminas como la virginomicina y pristinamicina, la mezcla de gentamicina con aminósidos, el uso del trimetropim con sulfametoxazol y las mezclas con inhibidores de beta lactamasas (amoxicilina – ácido clavulánico y piperacilina – tazobactam).

A pesar de esta breve referencia sobre familias de antibióticos, existen otros grupos de compuestos naturales y drogas no – antibióticas que pueden generar sinergismo con antibióticos conocidos (Ejim *et al.*, 2011; Hemaiswarya *et al.*, 2008)

En el 2008, Fukumoto *et al.*, reportan el hallazgo del Cyslabdan, un diterpeno con gran efecto potenciador de los carbapenems producido por *Streptomyces* sp. K04-0144. A su vez, Shin *et al.* (2010) reportó el hallazgo del 1 acetil – beta carbolina producida por una cepa de *Streptomyces* sp. de origen marino, un alcaloide con capacidad potenciadora de beta lactámicos. En ambos estudios de compuestos sinergistas



aislados de actinomicetos, los autores mencionan el interés por determinar el mecanismo de acción debido a la necesidad de encontrar nuevos compuestos sinérgicos.

Desde el punto de vista de la ecología química, los metabolitos secundarios producidos por actinomicetos cumplen un rol importante en los aspectos de competencia microbiana y adaptabilidad a un determinado microcosmos. Diferentes autores en los últimos 30 años han propuesto diversas teorías que explican el metabolismo adaptativo de los actinomicetos para la producción de compuestos de acción complementaria.

Así, Chater y Merrick (1979) explicaron inicialmente la necesidad de *Streptomyces* de producir compuestos antimicrobianos con el objetivo de adaptarse a su propio nicho. Su planteamiento está relacionado con el comportamiento “depredatorio” de estos microorganismos, los cuales usan los nutrientes provenientes de su propio micelio de sustrato muerto. Ellos explican que estos microorganismos pueden producir compuestos antibacterianos con el fin de proteger de otros microorganismos la reserva de nutrientes generada a partir de su micelio de sustrato, hecho que le permite obtener suficientes nutrientes en su ambiente. Esta afirmación puede apreciarse de cierta forma *in vitro*, debido a que experimentos de tipo fermentativo muestran que, generalmente, el inicio de la producción de compuestos antimicrobianos se da entre el final del desarrollo del micelio de sustrato y el inicio del desarrollo del micelio aéreo (Elliot *et al.*, 2008).

Firn y Jones (2000) proponen la producción de compuestos antimicrobianos de “alta y baja afinidad” dirigidos a diferentes moléculas blanco de sus competidores microbianos. Los autores explican que la adaptación metabólica hace que los actinomicetos produzcan por lo general uno o una cantidad limitada de antimicrobianos

de gran potencia antibiótica, los cuales son complementados con la producción de muchos otros compuestos que no presentan mucha afinidad sobre un blanco. Esta adaptación ocurriría en el ambiente con el objetivo de evitar la formación de cepas resistentes a múltiples antibióticos durante la evolución de las especies.

Revisando la bibliografía, vemos que los estudios de las moléculas sinérgicas producidas por actinomicetos están relacionadas con inhibidores de mecanismos de resistencia (ácido clavulánico), compuestos complementarios que tienen un mecanismo de acción similar (estreptograminas) o también de compuestos con mecanismos de acción y sitios blanco diferentes (Challis & Hopwood, 2003). Estos datos permiten evidenciar la enorme diversidad metabólica de los actinomicetos.

Con los datos obtenidos se podría pensar que el sinergismo de la fracción II con los aminoglucósidos y betalactámicos sería explicado presuntivamente por la presencia de algún compuesto capaz de inhibir la síntesis de pared celular o que permita una mejor permeabilización del antibiótico referencial; de esta manera, Vakulenko y Mobashery (2003) evidenciaron este hecho en sus trabajos experimentales de sinergismo con aminoglucósidos. Sin embargo en la presente tesis, ninguna afirmación puede aceptarse en su totalidad hasta que no se obtenga el compuesto purificado y se trate de conocer su mecanismo de acción.

Con respecto a la caracterización morfológica de *Streptomyces* M10-77, las técnicas de tinción permitieron corroborar la identificación supragenérica de la cepa en estudio colocándola dentro del género *Streptomyces*.

Se realizó un esfuerzo por obtener una clasificación a nivel de especie a partir de algunas características bioquímicas. Williams *et al.* (1983) muestran en la edición del Manual de Bergey (novena edición) que los criterios de clasificación para las especies

de *Streptomyces* son complicados de manejar debido a la enorme aparición de cepas con ligeras variantes bioquímicas, haciendo dificultosa su clasificación. De esta manera, el manual muestra una clasificación de un número limitado de especies basado en probabilidad y taxonomía numérica, que indica la probabilidad de que una especie presente la característica dada. Son muy pocas las características con un porcentaje mayor del 90%, por lo que esa clasificación se consideraría subjetiva.

Por otra parte, el International Streptomyces Project (ISP) determinó desde los años 60 ciertos patrones de crecimiento y expresión de pigmentos que podrían utilizarse de manera referencial para poder establecer una clasificación adecuada. Sin embargo debemos mencionar que en dicha metodología también juega un rol importante el criterio de probabilidad.

Por estas razones, los resultados obtenidos en la presente tesis nos permiten afirmar únicamente el género de la cepa en estudio, concluyendo la clasificación taxonómica a nivel de género.

Información sobre la identificación molecular de la cepa en estudio fue gentilmente brindada por el Dr. Hinsby Cadillo – Quiroz (University of Illinois, USA). Este aspecto no ha sido considerado en la metodología de la presente tesis, sin embargo se considera como información anexada debido a su importante valor para la discusión del trabajo.

El árbol filogenético que muestra a la cepa M10-77 relacionada filogenéticamente con la especie *Streptomyces erythrogriseus* es mostrado en el Anexo 3. Los únicos reportes de esta cepa hacen referencia a actinomicetos aislados de ambientes terrestres, donde se reportó el aislamiento de esta especie productora de los antibióticos Erigrisina e Itamicina (de Melo *et al.*, 1979). A pesar de esos reportes, hemos evidenciado que la cepa del presente estudio presenta por lo menos cuatro

compuestos con actividad antibacteriana y una con capacidad sinérgica de antibióticos referenciales.

Los estudios de Taddei *et al.*, (2006) concluyen que dos cepas de la misma especie de *Streptomyces* pueden ser productoras de compuestos diferentes, hecho que sumado a la diferencia de procedencia, justificaría que la cepa en estudio podría ser un *S. erythrogriseus* con capacidad multi-productora de antibióticos no reportados anteriormente para la especie en estudio.

## 7. CONCLUSIONES

1. La cepa *Streptomyces* M10-77 proveniente de fondos marinos es una cepa productora de múltiples metabolitos antibacterianos.
2. Los compuestos activos obtenidos de *Streptomyces* sp. M10-77 son eficaces frente a cepas patógenas de referencia así como a patógenos de origen clínico, hecho corroborado por los valores CMI obtenidos en los diferentes ensayos del extracto activo.
3. Los diferentes metabolitos activos producidos por *Streptomyces* M10-77 muestran una cierta interdependencia, traducida en un fenómeno de sinergismo.
4. *Streptomyces* M10-77 es productora de compuestos que potencian la actividad de otros antibióticos de mayor potencia. La fracción II obtenida por cromatografía en columna contiene al compuesto que es sinérgico con antibióticos betalactámicos y aminoglucósidos.

## 8. RECOMENDACIONES

1. Focalizar preferentemente la búsqueda intensiva de antimicrobianos dirigida a grupos químicos específicos como terpenos, quinonas, péptidos, macrólidos, etc.; de manera que el fraccionamiento siga pasos más específicos para su aislamiento.
2. Llevar a cabo la optimización del proceso fermentativo para cada cepa microbiana en estudio, pues estos datos permiten obtener un mayor rendimiento de extracto activo, lo que conlleva un menor gasto de material y un ahorro de tiempo.
3. Debido a que la identificación de cepas de actinomicetos del género *Streptomyces* aún presenta ciertas complicaciones, es recomendable el uso de técnicas moleculares, utilizando para esto los *primers* universales de RNAr 16s, así como otros propuestos en la literatura para regiones génicas más específicas, como el V6 RNA 16s (Jensen & Lauro; 2008)
4. Estudios más profundos orientados a la ecología de este grupo microbiano podrían realizarse con el objetivo de conocer si esta cepa pertenece al grupo de actinomicetos “MAR” que presentan requerimientos marinos obligados. Así, Imada *et al.* (2007) confirmaron que una cepa de actinomiceto marino relacionada con el género *Micromonospora* tenía al sodio y al magnesio como elementos limitantes para la producción de antibióticos.

5. Realizar los trabajos relacionados con el aislamiento biodirigido de metabolitos bioactivos por equipos multidisciplinarios de investigación, de manera que cada grupo aporte con su saber y experiencia en cada fase del proceso. Se recomienda realizar este tipo de trabajos con apoyo o asesoría de especialistas en el área de química o bioquímica.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAR, J. Antibiotic synergy and antagonism. *Medical Clinics of North America*. 2000. Volumen 84, N° 6.
- ADIKARAM, N. & BANDARA, B. Methodology for studying defense mechanism against fungal pathogens: an overview, *ACIAR proceedings*, Canberra 1998. (80), 181-184.
- ADINARYANA, G.; VENKATESHAN, M.; BPIRAJU, V. *et al.* Cytotoxic compounds from the marine actinobacterium. *Bio Org Khim*, 2006. 32:328–334.
- ADINARAYANA, G.; VENKATESAN, M.; VENJAMURI, S. *et al.* Resistoflavine, cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. *Microbiological Research*. 2007. 162; 322—327
- AGOGUE´, H., CASAMAYOR, EO. ; BOURRAIN, M.; *et al.* A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol*. 2005, 54:269-280.
- ASOLKAR, R.; KIRKLAN, T.; JENSEN, P.; *et al.* Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *The Journal of Antibiotics*. 2009 .1–3.
- BELLOSO, W. Historia de los Antibióticos. *Rev. Hosp. Ital. B.Aires*. 2009. Vol N°2, Diciembre.
- BERNAN, V. Metabolites of Free-Living, Commensal, and Symbiotic Benthic Marine Microorganisms. 2001. En '*Marine Chemical Ecology*', de Mc Clintonck & Baker.
- BIBB, M. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*. 2005, 8:208–215.



- BLANCHETTE, RA. ; SUTHERLAND, JB. & CRAWFORD, BL. The role of Actinomycetes in discoloration and decay process of living silver maple trees. *Phytopath.* 1981. 67; 204
- BULL, AT.; STACH, J., WARD, AC.; GOODFELLOW, M. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2005, 87:65-79.
- BURCHALL JJ. Synergism between trimethoprim and sulfamethoxazole. *Science.* 1977. 197:1300 – 1301.
- BUSH K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin Microb Rev.* 1988. 1:109-123.
- BUSHBY, S. & HITCHINGS, H. Trimethoprim: A sulfonamide potentiator. *Br J Pharmacol Chemother.* 1968. 33:72-90.
- CASAL, M.; VAQUERO, M.; RINDER, H.; *et al.* *Microbial Drug Resist.* 2005. 11, 62–67.
- CHALLIS, G. & HOPWOOD, D. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *PNAS.* 2003. vol. 100, suppl. 2; 1455 – 14561
- CHAMBERS, H.F., The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 2001. 7, 178–182.
- CHARAN, R.; SCHLINGMANN, G.; JANSO, J.; *et al.* Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp. *J Nat Prod.* 2004. 67:1431-1433.
- CHATER, K. & MERRICK, M. *Streptomyces*. En Parish, J. *Developmental Biology of Prokaryotes*, (Blackwell, Oxford). 1979. Pp. 93 – 114.
- CHATER, K. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2006. (361); 761-768.

- CHAUHAN, D.; CATLEY, L.; LI, G.; *et al.* A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell*. 2005, 8:407-419.
- CHO, J.; KWON, H. & WILLIAMS, P. 2006. Azamerone, a terpenoid phthalazinone from a marine derived bacterium related to the genus *Streptomyces* (Actinomycetales). *Org Lett* 2006. 8:2471–2474.
- COLQUHOUN, J.A., MEXSON, J., GOODFELLOW, M., *et al.* Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998. 74: 27–40.
- CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*. 1997. 60, 52–60.
- DE MELLO, J.; DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETOLLO, G.; *et al.* Itamycin, a new antibiotic produced by *Streptomyces erythrogriseus*. II. Identification with resistomycin. *Rev. Inst. Antibiot. Univ. Fed. Pernambuco Recife*. 1971 11:3–6.
- DELONG, E.; FRANKS, E. & ALLDREDGE, A. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol Oceanogr*. 1993, 38:924-934.
- DEL TREDICI, P. A Nitrogen Fixation: The Story of the Frankia Symbiosis. 1995. *Arnoldia*. Invierno.
- DHARMARAJ, S. & SUMANTHA, A. Bioactive potential of *Streptomyces* associated with marine sponges. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009. 25:1971–1979.
- EJIM, L.; FARHA, M.; FALCONER, S. *et al.* Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nature chemical biology*. 2011. doi: 10.1038/NChemBio.559.
- ELLIOT, M.; BUTTNER, M & NODWELL, J. Multicellular development in *Streptomyces*. En: WIHTWORTH, D. Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation. ASM Press, 2008. Washington D.C. p 419 – 439.

- EMBLEY, T. & STACKEBRANDT, E. The molecular phylogeny and systematics of actinomycetes. *Ann Rev. Microbiol.* 1994. (48) 257 – 289.
- ERPICUM, T. ; GRANIER, B. ; DELCOUR, M. ; *et al.* Enzyme production by genetically engineered *Streptomyces* strains: Influence of culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering.* 1990. pags 719–726, 25 Marzo.
- EL SHAHED, K.; EL DIWANY, A. & AWWAD, H. Enhanced production of Streptomycin and hydrolytic enzymes by *Streptomyces griseus* strains using different types of organic solvents and detergent compounds. *Indian Journal of Biotechnology.* 2008. Julio. Vol 7. p 341- 348.
- FABRICANT, D.S., FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives.* 2001. 109, 69–75.
- FENICAL, W.; JENSEN, P.; PALLADINO, M.; *et al.* Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorg Med Chem.* 2009 Marzo 15; 17(6): 2175
- FIRN, R.D. & JONES, C.G. The evolution of secondary metabolism – a unifying model. *Mol. Microbiol.* 2000. 37, 989–994.
- FUKUMOTO, A.; KIM, Y.; MATSUMOTO, A.; *et al.* Cyslabdan, a New Potentiator of Imipenem Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Produced by *Streptomyces sp.* K04-0144. *J. Antibiot.* 2008. 61(1):1–6.
- GADKARI, D.; MORSDORF, G. & MEYER, O. Chemolithotrophic assimilation of dinitrogen by *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1: Identification of an unusual N<sub>2</sub> – fixing system. *J. Bacteriol.* 1992. (174); 6840 – 6843.
- GIAMARELLOU, H. Aminoglycosides plus beta-lactams against Gram-negative organisms. Evaluation of in vitro synergy and chemical interactions. *Am J Med* 1986; 80(6B):126-137.

- GIL, M. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Rev Chil Infect.* 2000. 17 (2); 145 – 152.
- GOODFELLOW, M. & HAYNES, J.A. Actinomycetes in marine sediments. En Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L.F. & Yakoleff, V. *Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. 1984. (eds). New York, USA: Academic Press, pp. 453–472.
- GOODFELLOW, M. Suprageneric classification of actinomycetes. En Williams S.T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. 1989 Vol. 4. Baltimore. p 2333 – 2339
- GROSSART, HP.; SCHLINGOFF, A.; BERNHARD, M.; *et al.* Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. *FEMS Microbiol Ecol.* 2004, 47:387-396.
- GUTMANN, L.; KITZIS, MD; YAMABC, S., *et al.* Comparative evaluation of a new p-lactamase inhibitor, YTR 830, combined with different p-lactam antibiotics against bacteria harbouring known p-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986. 29:955-957.
- HASTE, N.; PERERA, V.; MALONEY, K.; *et al.* Activity of the streptogramin antibiotic etamycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics*. 2010. 63, 219–224.
- HELMKE, E., & WEYLAND, H. (1984) *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea. *Int J Syst Bacteriol* 34: 127–138.
- HEMAISWARYA, S., DOBLE, M., 2006. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. *Phytother. Res.* 2006. 20, 239–249.
- HIGGINBOTHAM S. & C. MURPHY. Identification and characterisation of a *Streptomyces* sp. Isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*. 2010. 165; 82—86.
- HOPWOOD, D. *Practical Streptomyces Genetics*. 2da edición. Norwich, England: John Innes Foundation.2000. ISBN 0-7084-0623-8.

- HSIAO, N. & KIRBY, R. Comparative genomics of *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces maritimus* and *Kitasatospora aureofaciens* using a *Streptomyces coelicolor* microarray system. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2008. 93:1–2.
- IMADA, C.; KOSEKI, N.; KAMATA, N. et al. Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica*. 2007. 21:27–31
- INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Informe de la resistencia antimicrobiana en hospitales de Perú. 2007. p. 5-28.
- JENSEN, P. R., DWIGHT, R & FENICAL, W. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. 57:1102–1108.
- JENSEN, PR.; MINCER, TJ. ; WILLIAMS, PG. ; *et al.* Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005, 87:43-48.
- JENSEN, P & LAURO, F. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2008. 94:51–62
- KARAGOUNI, AD.; VIONIS, AP.; BAKER, PW.; *et al.* The effect of soil moisture content on spore germination, mycelium development and survival of seeded streptomycete in soil. *Microbiol. Releases*. 1993. (2); 47- 51.
- KARTHY, E.; RANJITHA, P. & MOHANKUMAR, A.. Antimicrobial Potential of Plant Seed Extracts against Multidrug Resistant Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MDR-MRSA). *Int. Jour. Biol.* 2009. Vol.1 N°1.
- KENNEDY, BW. & ALCORN, SM. Estimates of US Crop losses to procaryote plant pathogens. *Plant. Dis.* 1980. 64; 674-676.
- KIM, SB.; OH, HM.; KANG, H.; *et al.* Remarkable bacterial diversity in the tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J Microbiol Biotechnol.* 2004, 14:205-211.

- LAM, K. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Op. Microbiol.* 2006. 9:245–251
- LABEDA, D. & SHEARER, M. Isolation of Actinomycetes for Biotechnological Applications. En LABEDA, David; *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. 1990. 1º edición. Mc Graw Hill Publishing.
- LANVIN BS. Antibiotic cycling and marketing into the 21<sup>st</sup> century; a perspective from the pharmaceutical industry. *Infect Cont Hosp Epid.* 2000; 21(suppl.1):S32\_/5.
- LEIVA, S., YAÑEZ, M.; ZAROR, L.; *et al.* Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev. méd. Chile*. 2004. v.132 n.2 Santiago feb.
- LEÓN, J. & P. GARCÍA-TELLO. Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. *Rev. Per. Biol.* 1998. 5 (1): 47 – 64.
- LEÓN, J.; LIZA, L.; SOTO, I.; *et al.* Actinomycetes bioactivos de sedimento marinos de la costa central del Perú. *Rev. peru. biol.* 2007. 14(2): 259-270.
- LEÓN, J.; APONTE, J.; ROJAS, R.; *et al.* Estudio de actinomicetos marinos con capacidad de antimicrobiana frente a cepas *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MRSA) y *Enterococcus* – vancomicina resistentes (VRE). *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica.* 2011. 28(2).
- MACHERLA, V. ; LIU, J ; BELLOWS, C. ; *et al.* Glaciapyrroles A, B and C pyrrolsesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. Isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod.* 2005. 68:780– 783.
- MACKAY, M.; MILNE, K. & GOULD, I. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2000. 15; 125–129

- MAGARVEY, NA.; KELLER, JM.; BERNAN, V.; *et al.* Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70:7520-7529.
- MAINARDI, J. Associations d'antibiotiques pour le traitement des infections a *Staphylococcus aureus*. *Med. Mal. Infect.* 1997 ; 27, Especial : 217-24.
- MARTINEZ, J.A & SANCHEZ, F. Mecanismo de acción de los antibióticos. *Actualización: JANO*. Setiembre 2007. N.º 1.660. [www.doyma.es/jano](http://www.doyma.es/jano)
- MALDONADO, L.; STACH, J.; PATHOM-AREE, W.; *et al.* Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antoine Von Leeuwenhook* 2005. (67) 11- 18.
- MASKEY, R.; HELMKE, E. & LAATSCH, H. Himalomycin A and B isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate. *J Antibiot* (Tokyo) 56:942–949.
- MASKEY R., HELMKE, E.; KAYSER, O.; *et al.* Anticancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine Streptomycete and their absolute stereochemistry. *J Antibiot* (Tokyo) 2004. 57:771–779.
- MINCER, T.J.; JENSEN, P.; KAUFFMAN, C.A.; *et al.* Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68: 5005–5011.
- MOELLERING, R. & WEINBERG, A. Studies on antibiotic synergism against enterococci: Effect of various antibiotics on the uptake of 14C-labeled streptomycin by enterococci. *J Clin Invest.* 1971. 50:2580-2584.
- MOORE, B., TRISCHMAN, J.; SENG, D.; *et al.* Salinamides, anti-inflammatory depsipeptides from a marine Streptomycete. *J Org Chem* 1999. 64:1145–1150.
- MORAN, M.A., RUTHERFORD, L.T., & HODSON, R.E. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl Environ Microbiol.* 1995. 61: 3695–3700.

- NARAYANA, K. & VIJAYALAKSHMI, M. Chitinase production of *Streptomyces* sp. Anu 6277. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009. 40: 725 -733
- NASHER, M. & HAY, J. Synergy of antibiotics against *Streptomyces somaliensis* in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998. 41; 281–284
- OKAMI, K.; OKAZAKI, T.; KITAHARA, T.; *et al.* Studies on marine microorganisms :V. A new antibiotic, aplasmomycin, produced by a streptomycete isolated from shallow sea mud. *J Antibiot (Tokyo)*. 1976. Oct;29(10):1019-25.
- OKAZAKI, T., & OKAMI, Y. Studies on actinomycetes isolated from shallow sea and their antibiotic substances, p. 123–161. En T. Arai (ed.), *Actinomycetes, the boundary microorganisms*. 1976. Toppan Co. Ltd., Tokyo.
- OLANO, C.; MÉNDEZ, C. & SALAS, J. Antitumour compounds from Marine Actinomycetes. *Mar. Drugs*. 2009, 7, 210-248.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Estrategia mundial OMS de contención de la resistencia a los antimicrobianos. 2001. p. 1 – 13.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Project: ICP BCT 001. 2004 Monitoring of antimicrobial resistance. Report of an Intercountry Workshop, Vellore, Tamil Nadu, India. 2004.
- PIETERS, L. & VLIETINCK, A. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. 100; 57–60
- PODUST, L.; BACH, H.; KIM, Y.; *et al.* Comparison of the 1.85 Å structure of CYP154A1 from *Streptomyces coelicolor* A3(2) with the closely related CYP154C1 and CYPs from antibiotic biosynthetic pathways. *Protein Science*. 2004, 13:255–268.
- POLK R. Use of modern antibiotics: emerging trends. *Opt Clin Infect Dis* 1999;29:264\_/74.



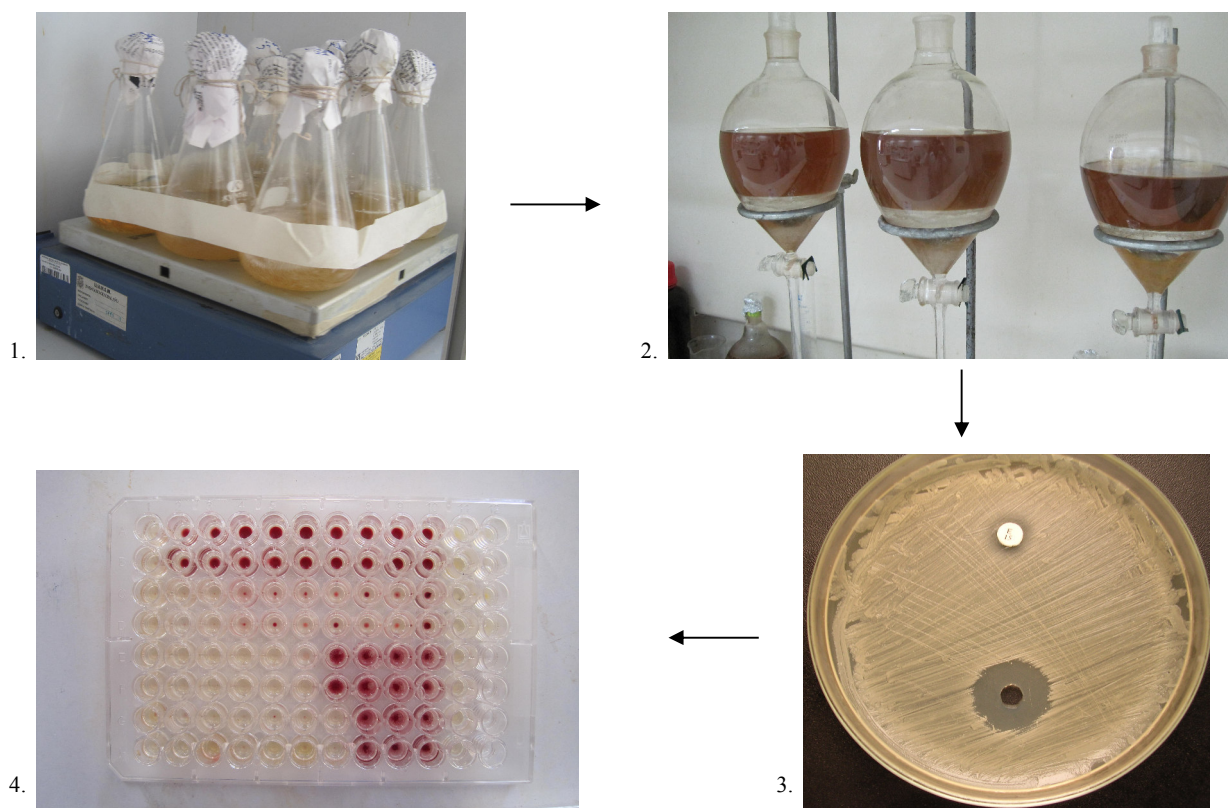
- RAPPE, MS., VERGIN, K. & GIOVANNONI, SJ. Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiol Ecol.* 2000, 33:219-232.
- RIEDLINGER, J.; REICKE, A; ZAHNER, H.; *et al.* Abyssomycins, inhibitor of the para – aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosisspora* strain AB-18-032. *J. antibio.* 2004 (Tokyo) 57: 271-279.
- SAID – SALIM, B.; MATHEMA, B. & KREISWIRTH, B. . Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: An emerging pathogen. *Infect Control Hosp.* 2003. Vol 24, N°6.
- SALAZAR, R. Simposio: Infectología. *Revista Diagnóstico.* 2008. 47(4), Octubre – Diciembre.
- SCHOENIANA, I.; SPITELLERB, M.; GHASTEB, M.; *et al.* Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. Febrero 1, vol. 108 no. 5 1955-1960
- SCHUMACHER, R., TALMAGE, S.; MILLER, S.; *et al.* Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment derived bacterium. *J Nat Prod* 2003. 66: 1291–1293.
- SHIN, H.; LEE, H. & LEE, D. The Synergistic Antibacterial Activity of 1-Acetyl- $\beta$ -Carboline and Lactams Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. 20(3), 501–505.
- SIMON, M.; GROSSART, HP.; SCHWEITZER, B.; *et al.* Microbial ecology of organic aggregates. *Aquat Microbiol Ecol.* 2002, 26:175-211.
- STACH, JE., MALDONADO, LA., WARD, AC., *et al.* *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, 54:191-194.
- STACKEBRANDT, E.; WITT, D; KAMMERLING, C; *et al.* Designation of Streptomycete 16S and 23S rRNA based targeted regions for oligonucleotide probes. *Appl. Env. Microbiol.* 1991. 57; 1468 – 1477.

- STACHEBRANDT, E.; LIESACK, W. & WITT, D. Ribosomal RNA and rDNA sequence analysis. *Gene*. 1992. (115); 255 – 260.
- SUJATHA, P.; BAPI RAJU, K. & RAMANA, T. 2005. Studies on a new marine Streptomyces BT 408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res*.160:119–126.
- TRIGER, EG. ; POLYANSKAYA, LM. ; KOZHEVIN, KA. , *et al*. Autoregulation on spore germination in streptomycetes grown on rich and poor media. *Mikrobiol*. 1991.(60); 461-465.
- URBAN, C.; GO, E.; MARIANO, N.; *et al*: Effect of sulbactam on infections caused by imipenemresistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype anitratus. *J Infect Dis*. 1993. 167; 448 – 451.
- VAKULENKO, S & MOBASHERY, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev*. 2003. Julio, 430-450
- WAGMAN, G. Antibiotics from Micromonospora. *Ann. Rev. Microbiol*. 1980. Vol. 34: 537-558.
- WAKSMAN, S. & WOODRUFF, B. *Actinomyces antibioticus*, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *J. Bacteriol*. 1941. 42, 231–24.
- WAKSMAN, S. & LECHAVELIER, H. Neomycin, a new antibiotic against streptomycin resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science*. 1949. 109; 305-307.
- WARD, A. & BORA, N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2006, 9:279–286.
- WELLINGTON, E.; CRESSWELL, N. & HERRON, P. Gene transfer between streptomycetes in soil. *Gene*. 1992. (115); 193-198.
- WALKER, J. D., & COLWELL, R. Factors affecting enumeration and isolation of actinomycetes from Chesapeake Bay and southeastern Atlantic Ocean. *Mar. Biol*. 1975. (30):193–201.

- WESTERDAHL A., J. OLSSON, S. Kjelleberg, *et al.* Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. 57(8): 2223–2228.
- WEYLAND, H., & E. HELMKE. Actinomycetes in the marine environment, p. 294–299. En Okami, Y.; Beppu, T. & Ogawara, H. *The biology of actinomycetes* '88. Séptimo Simposio Internacional de Biología de los Actinomicetos. 1988. Japan Scientific Society Press, Tokyo.
- WILLIAMS, S.; GOODFELLOW, M. & ALDERSON, G. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 1983. (129); 1743 – 1813.
- WILLIAMS, P.; MILLER, D.; ASOLKAR, R.; *et al.* Arenicolides A-C, 26-Membered Ring Macrolides from the Marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Org Chem.* 2007 July 6; 72(14): 5025–5034.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1



Proceso de obtención y evaluación de extractos con capacidad antimicrobiana. 1: Proceso de crecimiento en agitación de las cepas de actinomicetos seleccionadas. 2: Extracción de los metabolitos usando solventes orgánicos. 3: *Ensayos* de extractos para dilucidar que solvente capturó el compuesto inhibitorio por el método de difusión en agar. 4: Evaluación de CMI con el extracto activo.

## ANEXO 2

### COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO DE ACTINOMICETOS.- PRUEBAS CUALITATIVAS DE ANTAGONISMO Y PROCESO FERMENTATIVO

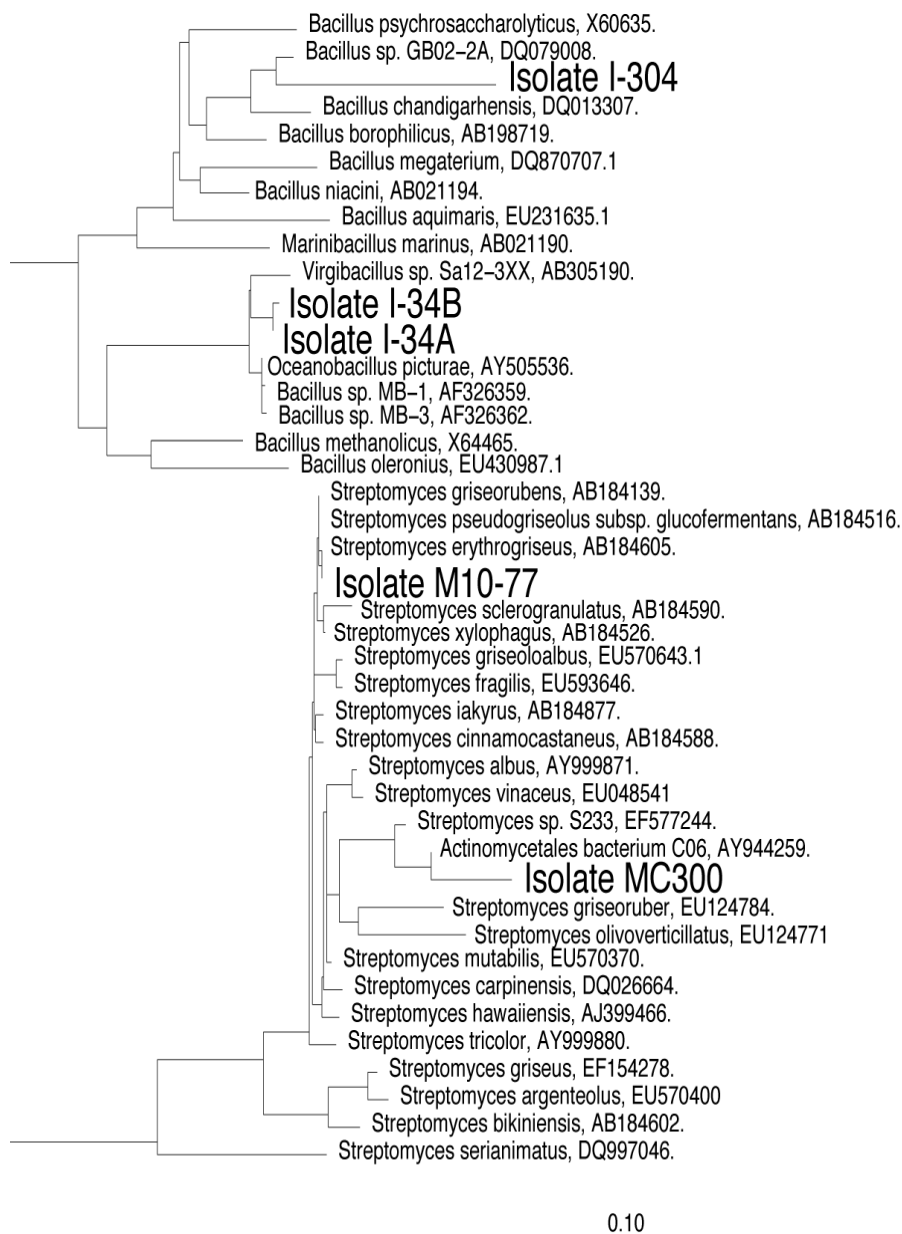
#### -AGAR MARINO PARA PRUEBAS DE ANTAGONISMO

Componente	g/L
Extracto de Levadura	1
Peptona de Soya	4
Agua de mar	750 ml
Agua destilada	250 ml

#### -CALDO MARINO MODIFICADO PARA FERMENTACIÓN

Componente	g/L
Extracto de Levadura	1
Peptona de Soya	4
Glucosa	5
Almidón	10
CaCO <sub>3</sub>	1
Agua de mar	750 ml
Agua destilada	250 ml

### ANEXO 3



Árbol filogenético que relaciona la cepa de *Streptomyces* M10-77 con diferentes especies del género *Streptomyces*. Basado en el algoritmo *Neighbour – joining*. Cortesía del Dr. Hinsby Cadillo – Quiroz (University of Illinois, USA)

